

N° d'enregistrement
au C.N.R.S. : A.O. 4521

THESE DE DOCTORAT D'ETAT ES SCIENCES NATURELLES

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES DE PARIS

par

Madame BUI DANG HA Duc

pour obtenir

le Grade de Docteur ès-Sciences

Sujet de la Thèse : RECHERCHES SUR LES METHODES DE PURIFICATION
DES CYTOKININES NATURELLES .

ISOLEMENT D'UNE CYTOKININE A PARTIR DE LA
RACINE D'ENDIVE (CICHORIUM INTYBUS L.) .

Soutenue le 29 octobre 1970 devant la Commission d'Examen

MM. GAUTHERET	Président
GUERN	} Examineurs
NITSCH	



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550209_0015

RECHERCHES SUR LES METHODES DE PURIFICATION
DES CYTOKININES NATURELLES.
ISOLEMENT D'UNE CYTOKININE A PARTIR DE LA
RACINE D'ENDIVE (CICHORIUM INTYBUS L.)

par

Mme BUI DANG HA DUC

1970

NOTES ON THE HISTORY OF THE
THEORY OF THE
THEORY OF THE
THEORY OF THE



THEORY OF THE

THEORY OF THE

AVANT PROPOS

Ce travail a été accompli au Laboratoire de Physiologie Pluricellulaire du C. N. R. S. à Gif-sur-Yvette sous la direction de Mr. le Professeur J. P. Nitsch : je tiens à lui exprimer ici ma très vive gratitude pour son accueil et les conseils qu'il m'a prodigués constamment au cours de mes recherches .

Mr. le Professeur R. J. Gautheret, membre de l'Institut, a bien voulu accepter de présider le jury de cette thèse m'accordant ainsi un honneur dont je lui suis particulièrement reconnaissante .

Mr. le Professeur J. Guern a examiné ce travail avec beaucoup d'attention. Ses suggestions ont permis de l'améliorer. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance pour tous les conseils qu'il m'a donnés .

Je remercie tout particulièrement Mr. le Professeur A. Moyse, mon parrain au C. N. R. S. , qui m'a accueillie toujours avec bienveillance et compréhension. Il a bien voulu lire cette thèse et me faire part d'avis qui m'ont été précieux pour sa présentation finale . Qu'il en soit vivement remercié .

Mr. B. V. Milborrow de "Milstead Laboratory of Chemical Enzymology", Angleterre, m'a enseigné les méthodes de chromatographie. Il trouvera ici la justification de ses efforts et aussi mes sincères remerciements .

Mr. le Dr. B. H. Most de "Tate and Lyle Research Centre", Mr. le Dr. Das de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles du C. N. R. S. à Gif-sur-Yvette m'ont été d'un inestimable secours lorsqu'il s'est agi d'identifier la cytokinine cristallisée. Je leur exprime toute ma reconnaissance pour leur aide compétente et leur gentillesse .

Mes remerciements vont également à Madame C. Nitsch dont l'amitié et la collaboration ne m'ont jamais manqué .

Mes collègues de laboratoire m'ont apporté cet environnement intellectuel et ce soutien logistique sans lesquels les recherches ne sauraient aboutir aujourd'hui. C'est un plaisir pour moi que d'exprimer mon amicale reconnaissance à MM. C. Bigot, H. Harada, M. Sandmeier J.C. Gandar et J. Durand, Mlles. L. Rossini et I. Lackmann .

Ma gratitude s'adresse aussi à Mlles S. Hamon et B. Norreel pour leur aide, à Mme A. Masset qui m'a secondée si efficacement par son dévouement son ardeur au travail et sa constante disponibilité, aux techniciens du Phytotron et des Superserres pour la culture et la récolte de l'endive ou pour la résolution rapide de tous les problèmes matériels qui se sont posés à moi au cours de ce travail .

C'est à Madame L. Morice qu'est revenue la tâche difficile de la mise en page et de la dactylographie dont elle s'est acquittée avec une conscience et célérité exemplaires .

Enfin, que toutes les personnes qui n'ont pas été citées dans les lignes précédentes et qui m'ont aidée par leurs conseils ou leurs encouragements trouvent ici l'expression de ma reconnaissance .

SOMMAIRE

	Pages
AVANT - PROPOS	
INTRODUCTION	4
1ère PARTIE : RECHERCHES SUR LES METHODES DE DETECTION, EXTRACTION ET PURIFICATION DES CYTOKININES NATURELLES .	5
I - <u>Etude de quelques méthodes de détection des cytokinines .</u>	
A - Test feuille d'avoine .	6
B - Test moelle de tabac .	7
II - <u>Méthodes d'extraction .</u>	8
A - Cas de matériel lyophilisé, exemple de l'okra .	
1. Recherche d'un solvant d'extraction des cytokinines .	9
2. Elimination de substances du type auxine et gibbérelline .	
a) Extraction préalable à l'éther	10
b) Effet d'une post-extraction à l'éther	
3. Activité de l'extrait à l'éther sur le test moelle de tabac .	11
4. Conclusion .	
B - Cas de matériel frais .	
1. Extraction à l'eau bouillante.	
2. Extraction au méthanol .	12
C - Conclusions .	13
III - <u>Méthodes de purification .</u>	
A - Méthodes chimiques	
1. Précipitation aux métaux lourds .	
a) Précipitation de cytokinines par les ions Ag	14
b) Précipitation en milieu aqueux ou méthanolique .	16
c) Effet d'une acidification sur l'efficacité de la précipitation à l'argent .	
d) Conclusions .	17
2. Précipitation au baryum .	
B - Méthodes physiques .	
1. Adsorption sur charbon actif .	18
a) Expérience 1	
b) Expérience 2	19
c) Expérience 3	20
d) Conclusions .	

2. Partage entre liquides non miscibles .	
a) Emploi d'acétate d'éthyle .	
b) Emploi du butanol secondaire .	21
3. Chromatographie sur couches minces .	
4. Chromatographie sur pellicules .	22
IV - <u>Conclusions</u> .	23
A - Présence de cytokinines dans des matériels divers.	
1. Les graines immatures d'okra .	
2. Les tubercules de topinambour .	
3. Les racines d'endive .	
4. La sève de vigne .	
5. Les graines immatures de pois .	
B - Une méthode d'extraction et de purification des cytokinines naturelles .	24
IIème PARTIE : ISOLEMENT D'UNE CYTOKININE A PARTIR DE LA RACINE D'ENDIVE .	26
I - <u>Introduction</u> .	
A - Propriétés de bourgeonnement de la racine d'endive .	26
B - Présence de cytokinine dans la racine d'endive .	
II - <u>Extraction</u> .	
A - Extraction en masse .	27
B - Activité de l'extrait brut. Effet du mode de stérilisation.	
III - <u>Purification de l'extrait brut</u> .	28
A - Précipitation par le baryum .	
B - Etude de la fraction précipitée aux ions Ba^{++}	
1. Précipitation à l'argent .	
2. Purification de la fraction P_1 .	30
C - Etude de la fraction non précipitable aux ions Ba^{++} .	
1. Chromatographie sur colonne Dowex .	
2. Partage entre liquides non miscibles .	31
3. Purification de l'extrait alcalin .	
4. Purification de l'extrait acide .	32
5. Purification de la bande absorbante .	33
6. Obtention d'une cytokinine cristallisée .	34
IV - <u>Identification chimique de la cytokinine cristallisée</u> .	34
A - Position chromatographique .	
B - Présence de ribose .	
C - Spectre d'absorption dans l'ultraviolet .	35
D - Chromatographie en phase gazeuse .	
E - Spectre de masse .	
F - Conclusions .	36

	Pages
IIIème PARTIE :	38
1. Ubiquité de la zéatine chez les végétaux supérieurs .	
2. Lieux de synthèse des cytokinines naturelles .	
3. Transport et métabolisme des cytokinines .	40
4. Origine des cytokinines de la racine d'endive .	42
5. Rôle des cytokinines de la racine d'endive .	43
6. Rôle possible des cytokinines dans les phénomènes de régénération de bourgeons .	
Conclusion .	46
RESUME	47
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .	50

INTRODUCTION

Les cytokinines constituent un groupe de substances de croissance dont on découvre chaque jour davantage l'importance pour la division cellulaire, le maintien des synthèses protéiques dans la cellule, et de nombreux autres processus physiologiques (phénomènes d'organogénèse, de dormance, de floraison, de tubérisation, etc.). Si l'identité de certaines de ces substances est maintenant connue (voir Tableau I), il n'en reste pas moins que, dans de nombreux cas, on sait seulement qu'un extrait contient un composé appartenant à cette classe de substances. Le Tableau II donne quelques exemples de tels cas. Une meilleure compréhension du rôle joué par les cytokinines naturelles dans la vie des plantes ne va pas sans la connaissance de leur identité chimique. Pour y parvenir, il est nécessaire d'améliorer encore les méthodes d'extraction, de purification et de détection des cytokinines .

Dans une Première Partie, nous avons donc essayé diverses méthodes de détection, extraction et purification des cytokinines, en nous adressant à des matériels végétaux divers .

Dans une Seconde Partie, nous avons appliqué l'expérience acquise à l'étude d'un cas précis : celui des cytokinines de la racine d'endive. Ce travail a conduit à l'isolement d'une cytokinine naturelle qui a été identifiée .

TABLEAU I - LISTE DES CYTOKININES QUI ONT ETE IDENTIFIEES
CHIMIQUEMENT DANS LES PLANTES

Cytokinine	Source :		Référence
	Plante	Origine	
Zéatine	<u>Zea mays</u>	caryopses immatures	Letham 1963, 1966a
	<u>Prunus domestica</u>	fruits immatures	Letham 1966a
	<u>Malus sylvestris</u>	fruits immatures	Letham et Williams 1969
	<u>Cucurbita pepo</u>	graines immatures	Gupta 1969
Zéatine riboside	<u>Zea mays</u>	caryopses immatures	Letham 1966b
	<u>Cocos nucifera</u>	albumen liquide	Letham 1968
Zéatine ribotide	<u>Zea mays</u>	caryopses immatures	Letham 1966c
Dihydrozéatine	<u>Lupinus luteus</u>	graines immatures	Koshimizu et al. 1967
2-Méthylthiozéa- tine riboside	<u>Triticum vulgare</u>	germe du grain	Hecht et al. 1969
Isopentenyladénine (= 6- γ , γ -diméthyl- allylaminopurine)	<u>Corynebacterium fascians</u>	liquide de cultures	Helgeson et Leonard 1966
6N-Méthyl- adénine	<u>Pisum sativum</u>	graines immatures	Rogozinska et al. 1965
	<u>Corynebacterium fascians</u>	liquide de culture	Helgeson et Leonard 1966

TABEAU II - EXEMPLES DE CYTOKININES NON IDENTIFIEES DANS DES EXTRAITS VEGETAUX

Plante	Origine	Extrait	Purification	Identité probable	Référence
<u>Aesculus woerlitzensis</u>	sac embryonnaire	charbon actif élué à la pyridine	partage entre solvants, chromatographie	contiendrait de l'AIA	Shantz et Steward 1968
<u>Allanblackia floribunda</u>	embryon	eau			Kovoor 1953, 1954
<u>A. parviflora</u>	fluide séminal	-			Nitsch 1954
<u>Ananas comosus</u>	jeune fruit	eau bouillante			Nitsch 1965
<u>Annona muricata</u>	fruit	eau			Kovoor 1953
<u>Artocarpus integrifolia</u>	"	eau			"
<u>Begonia x cheimanthus</u>	feuille	éthanol 70 %	Dowex 50, pré- cipitation à l'Ag	zéatine	Heide et Skoog 1967
<u>Borassus flabellifer</u>	albumen	eau			Kovoor 1954
<u>Bryophyllum daigremontianum</u>	feuille et tige	éthanol 70 %	Dowex 50, pré- cipitation à l'Ag	zéatine	Heide et Skoog 1967
<u>Cattleya labiata</u>	ovaire immature	eau bouillante			Nitsch 1965
<u>Cichorium intybus</u>	racine	eau bouillante	charbon actif		Vardjan et Nitsch 1961
<u>Citrus sinensis</u>	fruit				Kovoor 1954
<u>Cornus mas</u>	fruit	eau bouillante	n-butanol		Nitsch 1965

Plante	Origine	Extrait	Purification	Identité probable	Référence
<u>Crotalaria pallens</u>	jeunes fruits	éthanol 70 %	résines		Zwar et al. 1963
<u>Desmodium illinoense</u>	racines				Syono, 1965
<u>Phaseolus coccineus</u>	graine	eau			Kovoor 1954
<u>Phaseolus coccineus</u>	cambium	eau	résine cationique		Zwar et col. 1963
<u>Cucurbita</u>	ovule	eau			Steward et Caplin 1952
<u>Helianthus annuus</u>	sève		résine cationique	zéatine	Kende 1965 Klämbt 1968
"	feuille	eau	"	zéatine et son riboside	Klämbt 1968
"	fruit		"	zéatine	Witham et Miller 1965
<u>Helianthus annuus</u>	tubercule	eau bouillante	charbon actif		Nitsch et Nitsch 1960
<u>Helianthus annuus</u>	albumen immature				Mauney et al. 1952
<u>Helianthus annuus</u>	graine immature	eau			Steward et Caplin 1952
<u>Lactuca sativa</u>	graine germée	éthanol 96 % bouillant	résines		Barzilai et Mayer 1964
<u>Tricopodesdon coultantii</u>	fruit	eau bouillante	charbon actif		Nitsch 1951, 1960
<u>Tricopodesdon coultantii</u>	thalle				Schneider et Voth 1965
<u>Phaseolus</u>	fruit	eau, éthanol			Steward et Simmonds 1954

Plante	Origine	Extrait	Purification	Identité probable	Référence
<u>cotiana tabacum</u>	cambium	eau	résine cationique		Zwar et col. 1933
"	tissus anergisés	éthanol 70 %	ions Hg ⁺⁺	noyau nicotinamide	Wood et col. 1969
<u>buntia</u>	tissus crown-gall fruit	éthanol 70 %	ions Hg ⁺⁺	noyau nicotinamide	Wood et col. 1969 Kovoor 1953
<u>assiflora edulis</u>	graine immature	méthanol			Nitsch 1965
<u>aseolus vulgaris</u>	racine	eau bouillante	résine échan- geuse d'ions		Seth et Wareing 1965 Bauer 1966a, b
<u>yscomitrium piriforme x</u>	cambium	eau	résine cationique		Zwar et col. 1963
<u>unaria hygrometrica</u>	graine immature	eau bouillante	résines		Rogozinski et al. 1965
<u>inus radiata</u>	graine immature	méthanol	partage entre solvants		Powell et Pratt 1964
<u>usum salivum</u>	jeune fruit	éthanol 70 %	résines		Zwar et al. 1963
<u>usum salivum</u>	péricarpe du tubercule	eau bouillante	charbon actif		Tizio, 1966
<u>usum salivum</u>	tissu crown-gall	éthanol 70 %	ions Hg ⁺⁺	noyau nicotinamide	Wood 1964
<u>usum salivum</u>	jeune fruit	eau bouillante			Nitsch et al. 1960
<u>itis vinifera</u>	fruit		divers solvants		Kovoor 1953a Loeffler et Van Overbeek 1964
"	sève		charbon actif		Nitsch et Nitsch 1965
"	"				

Plante	Origine	Extrait	Purification	Identité probable	Référence
<u>Zea mays</u>	caryopse immature	éthanol	résines	adénine avec acide aminé en position 6	Beauchesne et al. 1964
<u>Zea mays</u>	caryopse immature	éthanol	résines	2 purines substituées en positions 6 et 9, 1 purine substituée en position 6(a)	Letham 1968

(a) En plus de la zéatine, de son riboside et de son ribotide .

1ère PARTIE

RECHERCHES SUR LES METHODES DE DETECTION, EXTRACTION
ET PURIFICATION DES CYTOKININES NATURELLESI - ETUDE DE QUELQUES METHODES DE DETECTION DES
CYTOKININES .

Les cytokinines étant généralement des purines, on peut penser à détecter leur présence dans les extraits au moyen de leur absorption dans l'ultraviolet. Mais nombreux sont les composés naturels qui contiennent un noyau purique sans être pour cela des cytokinines. Seul un test biologique peut montrer si une zone de chromatogramme absorbant les rayons UV correspond réellement à une cytokinine. De plus, Wood et coll. (1969) ont montré que d'autres substances naturelles, qui ne sont pas des purines mais possèdent un noyau nicotinamide, ont également des propriétés de cytokinines. Pour ces deux raisons il est donc préférable d'employer un test biologique dans la recherche des cytokinines naturelles.

Il existe plusieurs types de tests biologiques pour les cytokinines [voir mises au point de Letham (1967) et de Nitsch (1968)]. Les uns mettent à profit des effets qui n'ont pas de rapports directs avec la division cellulaire : comme le retard dans la dégradation des chlorophylles (Osborne et McCalla, 1961 ; Kende, 1964, 1965) et la synthèse à l'obscurité de bétacyanines (Bamberger et Mayer, 1960 ; Köhler et Conrad, 1966 ; Conrad et Köhler, 1967 ; Bigot, 1968). D'autres mesurent la croissance de disques de feuilles (Kuraishi, 1959) ou de frondes de Lemna minor (Hillman, 1957) ou de Spirodela oligorrhiza (Letham, 1967). D'autres enfin emploient la formation de bourgeons sur les protonema de mousses

(Gorton et coll., 1957). Mais les véritables tests de divisions sont ceux de Jablonski et Skoog (1954) qui font appel à la moelle de tabac et de Miller (1963) qui emploie des cals de cotylédons de soja .

Nous avons essayé un test feuille d'avoine et surtout employé le test de Skoog modifié par Nitsch .

A - Test feuille d'avoine .

Le test feuille d'avoine mesure la propriété que possèdent les cytokinines de retarder la dégradation des chlorophylles chez les feuilles isolées. Il a été réalisé de la manière suivante :

Des caryopses d'avoine var. "Brighton" sont semés dans de la "Vermiculite" humide et soumis au régime climatique suivant : 16 h de lumière artificielle (25.000 lux environ); température : 27°C le jour, 17°C la nuit. Au bout de 7 jours, les 3 cm de l'extrémité de la 1ère feuille sont coupés. Les segments ainsi obtenus sont placés verticalement dans de petits béchers de 5 ml (10 par récipient) contenant 0,5 ml de l'extrait à étudier (dont les concentrations en substances actives ont été déterminées par des tests préliminaires). Le tout est placé à l'obscurité à 25°C. Quatre jours après, les feuilles-témoins sont généralement jaunies, mais celles qui ont absorbé une cytokinine restent plus ou moins vertes. Les segments de feuilles sont traités 3 fois au méthanol et la teneur en chlorophylles des extraits mesurée au spectrophotomètre à 657 nm.

Les résultats obtenus avec la kinétine, et deux autres cytokinines synthétiques (fig. 1) montrent bien que les produits employés freinent la disparition des chlorophylles .

B - Test moelle de tabac.

Le test feuille d'avoine ne mesure pas le pouvoir qu'ont les cytokinines de provoquer la division cellulaire. Aussi lui avons-nous préféré un test de division, qui, bien que plus long (il demande 3 semaines) nous a paru plus spécifique. Il s'agit du test moelle de tabac qui a aussi l'avantage d'être effectué en conditions stériles .

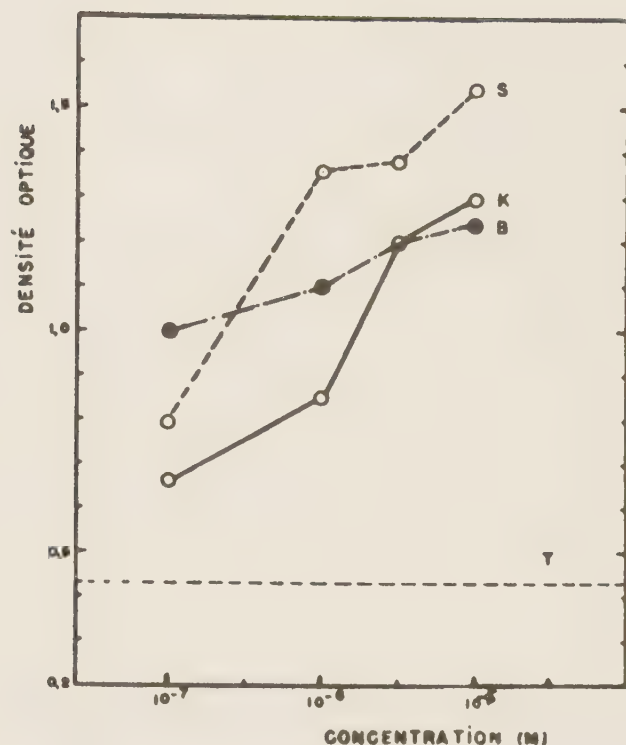


Fig. 1 - Test feuille d'avoine : Résultats obtenus avec K = kinétine,
S = 6(benzyl-9 tétrahydropyrane)-adénine,
B = benzyladénine .

La ligne pointillée représente les résultats obtenus avec des feuilles non traitées. En ordonnées : densité optique à 657 nm des extraits méthanoliques préparés à partir des feuilles traitées avec des cytokinines. En abscisses : concentration molaire des cytokinines .

Jablonski et Skoog (1954) ont montré que les cellules de moelle de tabac sont incapables de se diviser si on n'ajoutait pas au milieu de base à la fois une auxine et une cytokinine. En présence d'auxine, cette propriété peut donc être mise à profit pour doser les cytokinines. Plutôt que d'entretenir une souche de cal de moelle dont les propriétés peuvent varier au cours du temps, Nitsch (1960) emploie des fragments calibrés prélevés dans la moelle de plantes cultivées en serre. Au cours de nos expériences, nous avons toujours employé cette dernière technique .

Dans la moelle de la partie moyenne de tiges de la variété "Wisconsin 38" (plantes de 1 m à 1,50 m de haut), on prélève au trocard des cylindres de 5 mm de diamètre et de 5 mm de long. Le poids d'un explantat frais est de 85 mg. Ils sont couchés longitudinalement sur le milieu de culture qui comprend les éléments indiqués dans le Tableau III. Ce milieu est une adaptation de la formule de Murashige et Skoog (1962). Le pH est toujours ajusté à 5,5 avec de l'acide chlorhydrique ou de la soude avant l'addition de gélose .

Pour chaque concentration à étudier, 12 explantats sont ensemencés dans 12 tubes de 25 mm de diamètre contenant chacun environ 20 ml de milieu. Les cultures sont placées dans une pièce dont la température est de 25°C environ le jour et de 22°C environ la nuit. La lumière est fournie par une combinaison de tubes fluorescents et d'ampoules incandescentes allumées pendant 16 heures chaque jour. Au bout de 21 jours, les cals sont pesés directement au sortir des tubes pour obtenir le poids des tissus frais, puis après dessiccation à l'étuve à 60°C pendant 24 heures au moins pour déterminer le poids de matière sèche .

Le résultat obtenu avec une gamme de concentrations de kinétine est présenté dans la figure 2. On voit que la courbe passe par un maximum, puis décroît à mesure que la concentration en kinétine augmente. Cette situation peut sembler apporter une ambiguïté puisqu'une même croissance pondérale peut correspondre à deux concentrations différentes de kinétine. En réalité, l'aspect des cultures permet de savoir si l'on se trouve sur la partie ascendante ou descendante de la courbe. En effet, comme le montre la figure 3, lorsque la concentration en cytokinine est

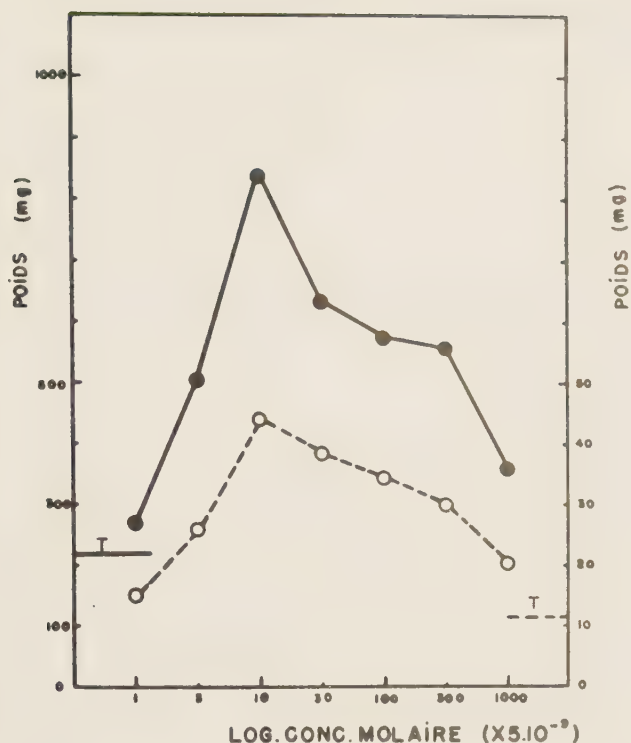


Fig. 2 - Test moelle de tabac.
 Augmentation de poids des explantats calibrés après 21 jours de culture sur des milieux contenant diverses concentrations de kinétine .
 Courbe en trait continu : poids de matière fraîche, courbe en trait pointillé : poids de matière sèche .
 Noter l'échelle logarithmique des abscisses .

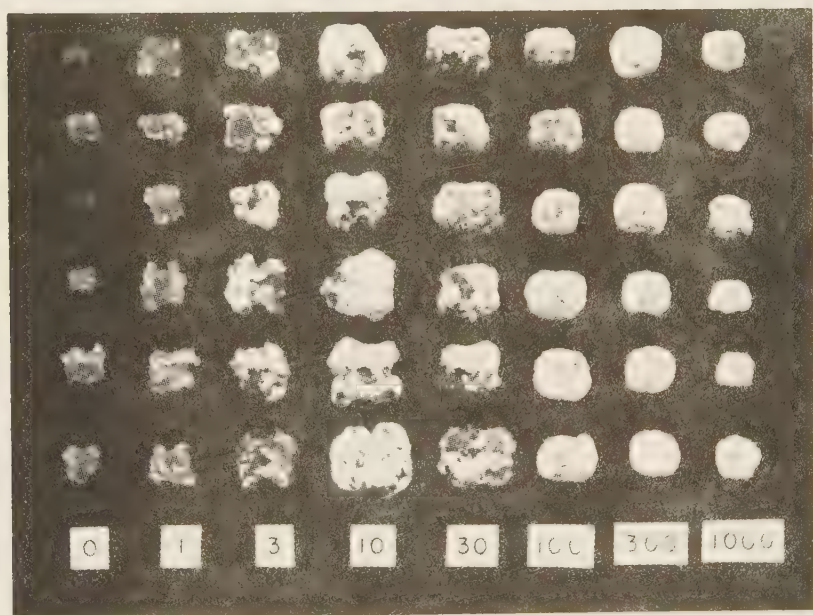


Fig. 3 - Aspect des fragments de moelle de tabac après 21 jours de culture sur des milieux contenant des concentrations de kinétine indiquées. (en μg par litre) .

TABLEAU III - COMPOSITION DU MILIEU DE BASE EMPLOYE
POUR LES TESTS MOELLE DE TABAC.

	Par litre :
<u>Macroéléments minéraux :</u>	
KNO ₃	1,90 gr
NH ₄ NO ₃	1,65
CaCl ₂ , 2 H ₂ O	0,44
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,37
K H ₂ PO ₄	0,17
<u>Oligo éléments :</u>	
Mn SO ₄ , 4 H ₂ O	25 mg
H ₃ BO ₃	10
ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	10
Na ₂ MoO ₄ , 2 H ₂ O	0,25
Cu SO ₄ , 5 H ₂ O	0,025
Solution de FeSO ₄ , 7 H ₂ O	
(5,57 gr) + Na ₂ EDTA (7,45 gr):	5 ml
<u>Substances organiques :</u>	
myo-inositol	100 mg
ac. nicotinique	5
glycine	2
pyridoxine HCl	0,5
thiamine HCl	0,5
ac. folique	0,5
biotine	0,05
ac. indolyl-3-acétique	1
L-glutamine	200
saccharose	30.000
agar (Difco)	8.000

relativement faible, les tissus ont un aspect assez lâche ; lorsqu'elle est forte, les cals ont des cellules petites et très serrées .

De toutes manières, les résultats que nous avons obtenus à l'aide du test moelle de tabac sont à considérer sur le plan qualitatif plutôt que sur le plan quantitatif. Ils nous ont principalement servi de fil conducteur pour savoir dans quelle fraction des extraits se trouvaient les cytokinines naturelles que nous recherchions .

II - METHODES D'EXTRACTION

Au cours de l'extraction de tissus vivants il est important d'arrêter les activités enzymatiques qui pourraient causer un changement qualitatif ou quantitatif dans les substances à étudier. Plusieurs méthodes peuvent être employées, par exemple l'inactivation des enzymes par la chaleur, par des solvants organiques comme les alcools, ou par des poisons tels que les métaux lourds .

Les méthodes ne seront pas les mêmes selon qu'on s'adresse à du matériel frais ou à du matériel préalablement lyophilisé .

A - Cas de matériel lyophilisé. Exemple de l'okra .

Les graines immatures d'okra (Hibiscus esculentus L.) fourniront un exemple d'extraction à partir de matériel lyophilisé .

1) Recherche d'un solvant d'extraction des cytokinines . -

Parmi les solvants les plus employés dans l'extraction des substances de croissance on peut distinguer trois types :

- ceux qui, comme l'éther sulfurique, extraient plus particulièrement les substances peu polaires,
- ceux qui, comme le méthanol , extraient une très large gamme de substances organiques ,
- ceux qui, comme l'eau, extraient surtout les composés polaires.

Dans un premier essai, 2,5 g de graines immatures d'okra ont été traités avec successivement : trois portions d'éther, trois portions de méthanol, enfin trois portions d'eau distillée bouillante .

L'activité biologique des 3 extraits successifs est présentée graphiquement sur la figure 4. On voit que l'éther n'a pratiquement pas extrait de cytokinines, alors que le méthanol a donné de bons résultats. Mais le méthanol a été incapable de retirer toutes les cytokinines puisque l'extrait aqueux qui l'a suivi, s'est montré très actif, lui aussi. Nous concluons de cette première expérience que l'eau bouillante est probablement le meilleur des 3 types de solvants essayés. Dans la suite de nos essais nous avons donc employé l'eau bouillante pour extraire les cytokinines à partir de tissus lyophilisés .

2) Elimination de substances du type auxine et gibbérelline. -

Pour nous débarrasser des substances du type auxine et gibbérelline qui pouvaient se trouver dans les tissus à l'état libre, nous avons effectué un traitement préalable du matériel lyophilisé soit à l'éther, soit à l'acétate d'éthyle .

a) Extraction préalable à l'éther. - Au cours d'une première expérience, nous avons traité 1 g de matériel lyophilisé constitué par des graines immatures d'okra récoltées 15 jours après la pollinisation en versant de l'eau bouillante sur la poudre sèche obtenue après broyage. Après filtration, nous avons répété le traitement avec deux nouvelles portions d'eau bouillante .

Parallèlement, nous avons effectué les mêmes opérations sur 1 g de matériel lyophilisé mais que nous avons préalablement traité trois fois avec 100 ml, 50 ml et 50 ml d'éther. Les résultats obtenus sont consignés dans la figure 5. On voit que le traitement préalable des graines à l'éther augmente légèrement l'activité de l'extrait aqueux, l'éther a enlevé au moins deux substances stimulantes dans le test "mésocotyle d'avoine" de Nitsch et Nitsch (1956) qui est sensible aux auxines et aux gibbérellines (fig. 6) .

b) Effet d'une post-extraction à l'éther. - Pour essayer de savoir si l'effet d'un traitement à l'éther était dû à l'enlèvement de barrières lipidiques plutôt qu'à l'extraction de substances inhibitrices au

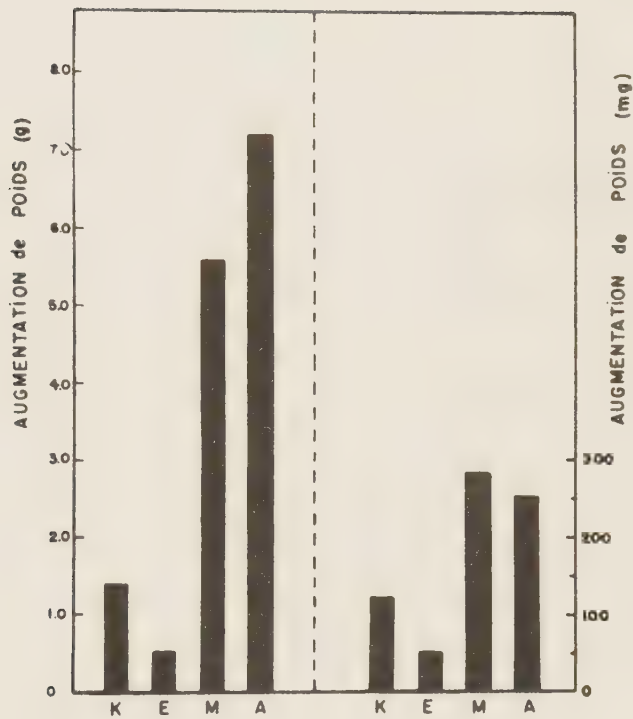


Fig. 4 - Test moelle de tabac. Activité biologique des fractions obtenues par des extractions successives des graines immatures et lyophilisées d'okra ; E = extrait étheré, M = extrait méthanolique, A = extrait aqueux, K = témoin avec kinétine ($5 \times 10^{-7}M$) .

En ordonnées : augmentation moyenne (12 fragments) de poids de matière fraîche (à gauche) ou sèche (à droite) .

test moelle de tabac, nous avons effectué, parallèlement aux précédents, les essais suivants :

1 g du même matériel lyophilisé a été traité directement 3 fois à l'eau bouillante. Après filtration, le liquide d'extraction a été traité 3 fois à l'éther donnant ainsi l'extrait étheré E_2 .

Les résultats (fig. 7) montrent qu'un traitement à l'éther de l'extrait aqueux donne des résultats moins satisfaisants qu'un pré-traitement du matériel sec avec le même solvant. L'hypothèse d'un effet de ce solvant sur les membranes cellulaires permettant une meilleure extraction par l'eau s'en trouve renforcée. En effet, si ce solvant enlevait un inhibiteur, il devrait pouvoir l'éliminer aussi bien à partir de l'extrait aqueux qu'à partir du matériel sec. La question ne peut malheureusement pas être tranchée aussi facilement. On remarque en effet, sur la figure 7 que la réponse biologique augmente avec la concentration dans le cas d'une pré-extraction, alors qu'elle diminue dans le cas d'une post-extraction, comme si un principe inhibiteur provoquait une réduction de la croissance aux doses élevées .

3. Activité de l'extrait à l'éther sur le test moelle de tabac. -

La situation est encore plus complexe. En effet, si l'on essaye sur le test moelle de tabac l'extrait à l'éther (E_1) on constate qu'il a une certaine activité de cytokinine (fig. 7). Une comparaison quantitative précise avec les extraits aqueux est difficile car l'activité biologique des deux types d'extraits a été éprouvée dans deux tests différents pour lesquels les séries-témoins avec kinétine elles-mêmes ont produit des augmentations de poids différentes .

4. Conclusions. - Retenons de tous ces essais qu'un traitement préalable d'un matériel lyophilisé aux solvants organiques tel que l'éther peut être utile. Cependant il n'est pas sans risque puisque, dans le cas présent, ce solvant a extrait des substances qui sont actives sur le test moelle de tabac .

Nous avons donc préféré, lorsqu'il s'agissait de matériel lyophilisé, extraire les cytokinines directement par l'eau bouillante. En agissant ainsi nous avons pu montrer que la concentration maximum en cytokinines avait

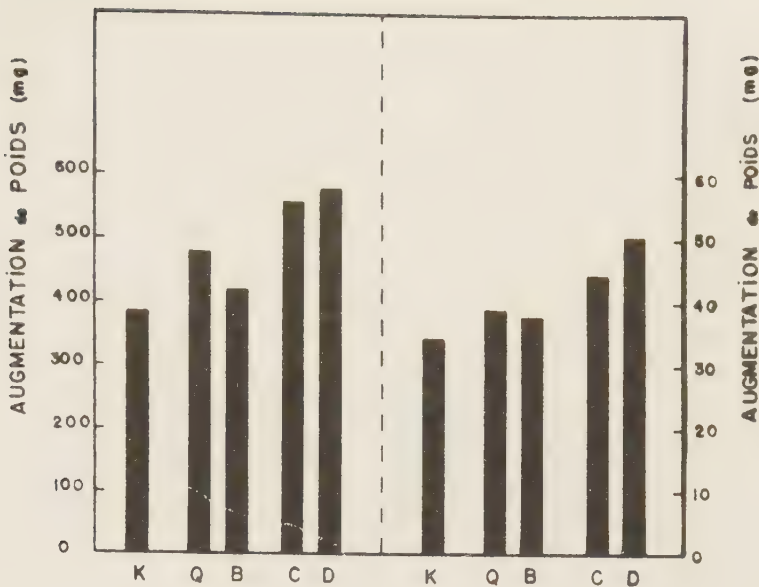


Fig. 5 - Test moelle de tabac. En ordonnées, augmentation moyenne (12 explantats) de poids de matière fraîche (à gauche) ou sèche (à droite). K = témoins avec kinétine ($5 \times 10^{-7}M$). Q et B = extraits aqueux de 100 mg et 900 mg de graines lyophilisées sans traitement préalable à l'éther. C et D = idem mais les graines ont été traitées à l'éther avant l'extraction aqueuse .

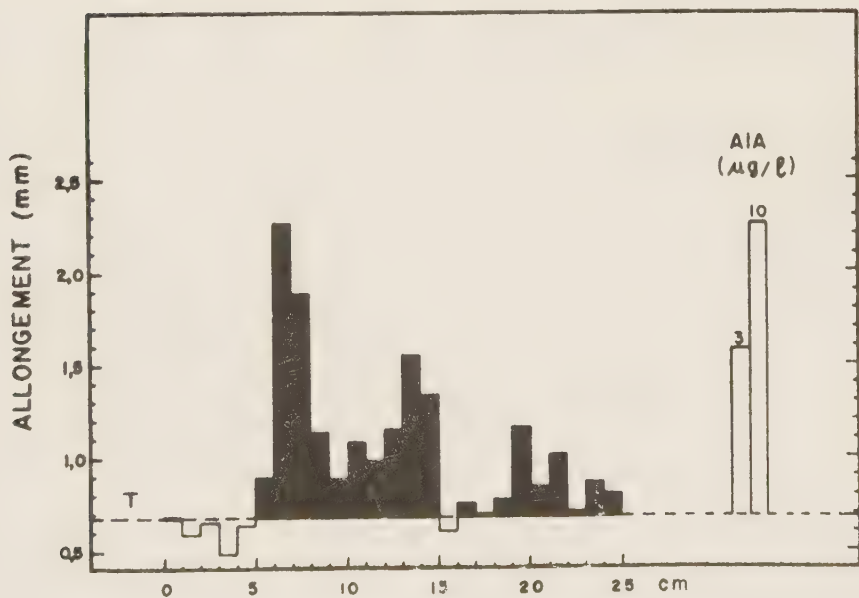


Fig. 6 - Activité, sur le test "mésocotyle" d'avoine, de l'extrait étheré de 5 mg de graines lyophilisées d'okra, chromatographié sur papier. Double chromatographie ascendante et unidimensionnelle d'abord dans le mélange isopropanol (80) + ammoniacque (0,05) + H_2O (20) sur une longueur de 20 cm, puis, après séchage, dans le mélange hexane (75) chloroforme (15) saturé d'eau sur 25 cm. En abscisses : position sur le chromatogramme. En ordonnées : allongements des segments de mésocotyles (moyenne de 10 segments); ceux dépassant l'allongement des témoins (ligne horizontale en pointillé) sont figurés en noir .

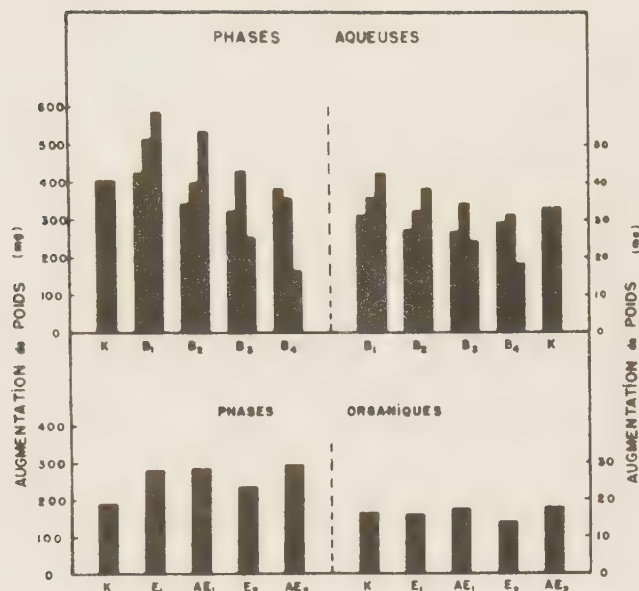


Fig. 7 - Test moelle de tabac de divers extraits de graines lyophilisées d'okra (5 jours après la pollinisation) .

K = kinétine à $5 \times 10^{-7} M$.

B₁ = extrait butanolique du matériel lyophilisé pré-extrait à l'éther .

B₂ = extrait butanolique du matériel lyophilisé pré-extrait à l'acétate d'éthyle .

B₃ = extrait butanolique d'un extrait aqueux pré-extrait à l'éther .

B₄ = extrait butanolique d'un extrait aqueux pré-extrait à l'acétate d'éthyle .

E₁ = extrait étheré du matériel sec .

AE₁ = extrait à l'acétate d'éthyle du matériel sec .

E₂ = extrait étheré de l'extrait aqueux .

AE₂ = extrait à l'acétate d'éthyle de l'extrait aqueux .

Trois concentrations correspondant à 15, 150 et 500 mg de matériel sec ont été faites pour chacun des extraits B₁, B₂, B₃ et B₄ .

Les extraits E₁, AE₁, E₂ et AE₂ correspondent à 500 mg de graines lyophilisées .

En ordonnées : augmentation de poids de matière fraîche (à gauche), et sèche (à droite) (moyenne de 12 fragments) .

lieu chez l'okra aux environs du 5e jour après la pollinisation (fig. 8). C'est précisément à ce moment qu'a lieu la chute brutale enregistrée par Nitsch (1962) dans la vitesse de la croissance de la tige (fig. 9) .

B - Cas de matériel frais.

Dans le cas de matériel frais, on peut penser à détruire toute activité enzymatique soit par la chaleur, soit par un alcool .

1. Extraction à l'eau bouillante. - La première méthode a été employée par Nitsch et Nitsch qui stérilisaient les tissus à 120° pendant un temps court avec de l'eau, réalisant en une opération l'inactivation des enzymes et l'extraction par l'eau bouillante. Cette technique a permis à ces auteurs de démontrer la présence de cytokinines dans la tomate (Nitsch et Nitsch, 1955, 1961 ; Nitsch, 1960) et dans le tubercule de topinambour (Nitsch et Nitsch, 1960). Or certaines substances inactives par elles-mêmes peuvent être transformées en cytokinines actives par chauffage prolongé.

2. Extraction au méthanol. - Nous avons donc essayé de vérifier la présence de cytokinines dans le tubercule de topinambour (Helianthus tuberosus L.) en extrayant ces substances à froid par le méthanol. Nitsch (1956) a montré en effet que cet alcool empêche tout brunissement des tissus .

Des tubercules pelés de la variété "D-19" ont été broyés dans du méthanol, à raison de 600 g de matériel frais par litre de méthanol absolu. Après filtration, le matériel végétal a été traité à nouveau deux fois avec 300 ml de méthanol chaque fois. Le volume final de l'extrait après filtration a été ajusté à 1,8 l avec du méthanol .

Après précipitation des cytokinines par l'argent (voir plus loin), l'extrait a été stérilisé par filtration sur membrane Millipore selon la technique de Nitsch et Nitsch (1956) et incorporé au milieu sans chauffage. Le test moelle de tabac a été positif, montrant ainsi que les cytokinines trouvées en 1960 par Nitsch et Nitsch dans le tubercule de topinambour ne constituaient pas un artéfact dû à la transformation d'une substance inactive au cours du passage à l'autoclave .

Nous avons appliqué cette technique d'extraction des tissus frais par le méthanol à d'autres cas. Par exemple, nous avons traité ainsi des fruits immatures de concombres et les racines d'endive dont il sera question

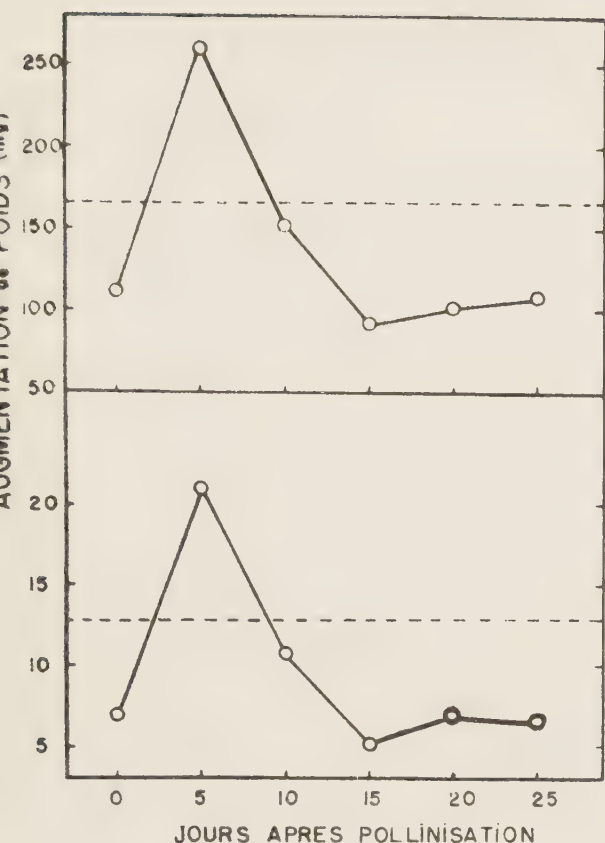


Fig. 8 - Variations du niveau des cytokinines dans les graines immatures d'okra au cours du développement du fruit.

En abscisses : jours après la pollinisation
En ordonnées : augmentation de poids (mg) des explants de moelle de tabac (moyenne de 12) .

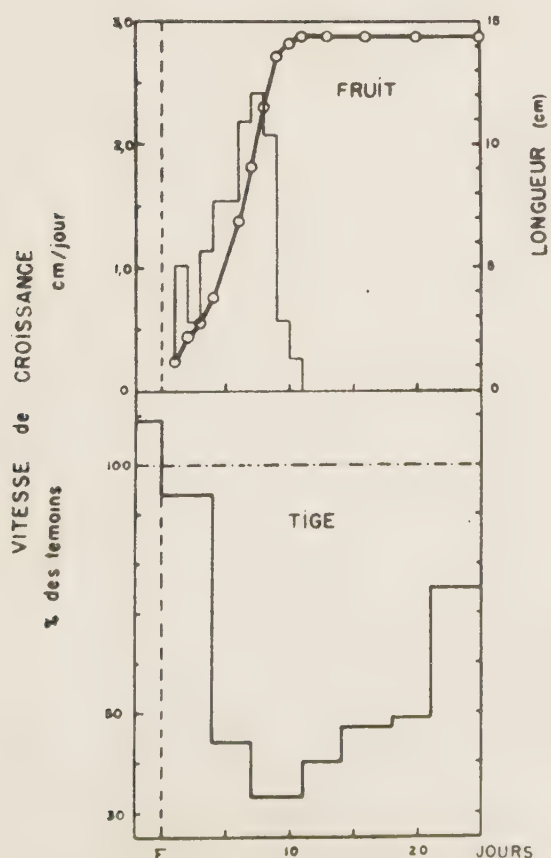


Fig. 9 - Variations de la vitesse de croissance de la tige d'okra en fonction du développement du fruit (d'après Nitsch, 1961) .

En haut : croissance du fruit. Courbe en trait fort : croissance en longueur .
Courbe en trait fin : vitesse de croissance (cm/jour). En bas : vitesse de croissance de la tige avec fruit. En abscisses : temps en jours après la floraison (F). En ordonnées : vitesses de croissance des tiges (échelle de gauche) et longueur du fruit (échelle de droite) .

dans la 2ème Partie. Dans tous ces cas, le méthanol (absolu au départ), mais devenu aqueux par l'eau des tissus) a extrait des cytokinines actives sur le test moelle de tabac .

C - Conclusions.

Qu'il s'agisse de tissus lyophilisés ou de tissus frais, il ressort des expériences qui précèdent que l'eau bouillante est probablement le solvant qui extrait le plus totalement des cytokinines naturelles. Le méthanol est aussi un bon solvant, principalement le méthanol aqueux, situation qui se trouve réalisée lorsqu'on traite des tissus frais avec du méthanol absolu.

III - METHODES DE PURIFICATION

Qu'ils soient méthanolique ou aqueux, les extraits qui proviennent de plantes contiennent un très grand nombre de substances différentes, parmi lesquelles il va falloir retirer sélectivement les cytokinines. Nous nous sommes attelée à cette tâche en employant diverses méthodes, que l'on peut grouper en méthodes chimiques et physiques .

A - Méthodes chimiques.

1) Précipitation aux métaux lourds. - A l'heure actuelle, on peut dire que la plupart des cytokinines naturelles sont des purines, et, plus précisément, des adénines substituées. A part un produit, dérivé de la nicotinamide et contenant un atome de soufre qui a été mis en évidence dans les tissus de crown-gall de Vinca rosea par Wood (1964), les cytokinines qui ont été identifiées chimiquement à partir de matériels divers sont toutes des purines (Tableau I) .

En se basant sur ce fait, on peut donc chercher un réactif des purines pour les séparer des autres substances contenues dans l'extrait brut. Une des propriétés chimiques des purines est d'être précipitées par les métaux lourds (ions Hg, Pb, Ag). Les premiers pas dans ce domaine ont été faits par Van Overbeek et coll. (1944) lorsqu'ils ont employé les ions Pb^{++} pour purifier le principe du lait de coco favorisant la croissance de jeunes embryons de Datura. Les ions Hg^{++} ont été employés par Shantz et Steward (1952) dans leurs expériences avec le lait de coco, Györfy et coll. (1955) dans le cas du lait de maïs, les

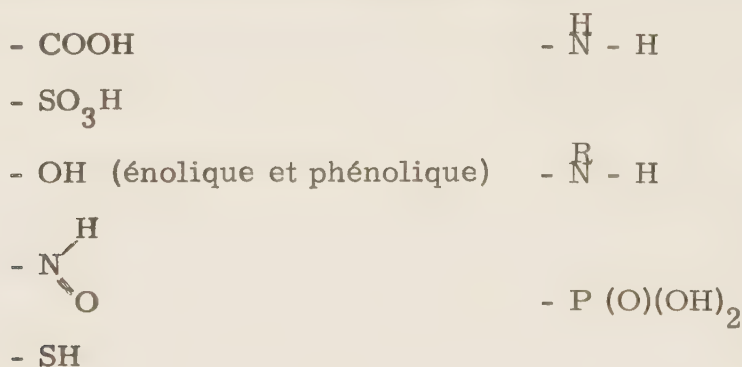
ions Pb^{++} par Zwar et Skoog (1963) dans le cas de graines immatures de pois, les ions Cu^{++} par Shaw et Srivastava (1964) dans celui du lait de coco. Nous avons utilisé les ions Ag^+ , méthode qui a été employée, en particulier, par Klämbt et coll. (1968) dans le cas du Corynebacterium fascians et par Koshimizu et coll. (1967) dans celui du lupin.

a) Précipitation de cytokinines par les ions Ag^+ .

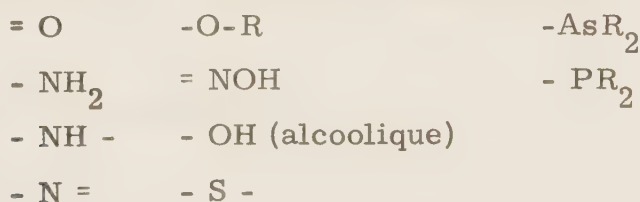
Principe : Pour pouvoir former un complexe avec des ions métalliques, une molécule doit remplir au moins deux conditions :

1°) Elle doit posséder au moins deux groupements fonctionnels appropriés. En se combinant avec l'atome métallique, les atomes donateurs d'un tel groupement sont capables de donner une paire d'électrons. Ces électrons peuvent être fournis par des groupements basiques coordonnants tel que NH_2 , ou par des groupements acides qui ont perdu un proton.

Quelques groupements acides qui se combinent avec les atomes métalliques par remplacement d'hydrogène sont :

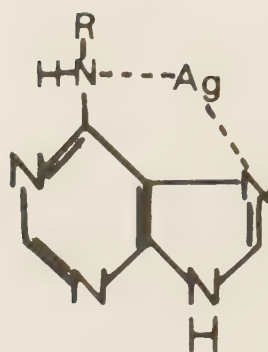
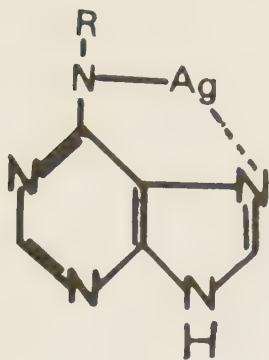


Les groupements coordonnants comprennent :



2°) les groupements fonctionnels doivent être situés dans la molécule de telle sorte qu'ils permettent la formation d'un cycle avec un atome métallique (Mellor, 1964).

Les cytokinines du type purines possédant un noyau imidazolique et un groupement -NH-R sur le noyau pyrimidine forment ainsi un complexe avec l'Ag tel que :



Ces purines peuvent, suivant le pH, exister sous plusieurs formes différentes, les complexes qu'elles engendrent dépendent donc de leurs formes ioniques .

Ainsi les bases libres sont précipitées à pH acide (1,5-2,0) tandis que les nucléosides sont précipitées en milieu légèrement en excès avec NaOH (Kerr et coll. 1945) .

A titre d'exemple, nous allons présenter une expérience effectuée avec un extrait à l'eau bouillante de graines d'okra lyophilisées, récoltées 5 jours après la pollinisation. Les manipulations ont été les suivantes :

200 g (matériel sec) ont été traités 3 fois à l'eau bouillante (1 l + 0,5 l + 0,5 l). Après filtration sur coton hydrophile puis sur papier, l'extrait a été refroidi et son pH ajusté à 2,8 avec de l'acide formique. A la température de 5° environ, on a ajouté une solution aqueuse d'AgNO₃ (160g/l). Après avoir laissé précipiter le complexe Ag-purines au froid pendant une nuit, on a séparé le précipité du liquide par centrifugation .

Le précipité a ensuite été dispersé dans 500 ml d'eau distillée, puis on y a ajouté une solution aqueuse de chlorure de sodium (30 g/l). L'argent a ainsi été combiné sous forme d'AgCl insoluble qui a précipité et a été éliminé par centrifugation .

Les deux fractions (fraction précipitable et non-précipitable à l'Ag) ont été fractionnées encore en une phase butanolique et une phase aqueuse. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 11. On voit tout de suite que l'argent a précipité la majeure partie des cytokinines. Dans la partie non précipitée, si la fraction butanolique est inactive, il reste cependant une certaine activité biologique dans la fraction aqueuse, qui correspondrait aux cytokinines ribosides ou ribotides .

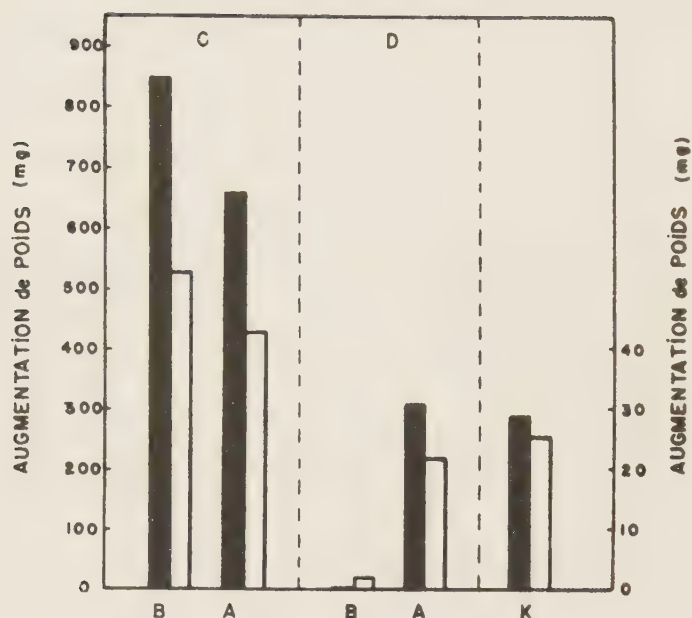


Fig. 11 - Précipitation des cytokinines par les ions Ag^+ .

Test moelle de tabac.

Chaque fraction correspond à l'extrait de 4 g de graines d'okra lyophilisées (5 jours après pollinisation) par litre de milieu de culture final. Chaque colonne correspond à la moyenne de 12 explantats. En noir : accroissements de poids de matière fraîche, en blanc : accroissements de poids de matière sèche .

C = fractions précipitées par l'argent. D = fractions non précipitées par l'argent. K = témoins avec kinétine 5×10^{-7} M. B = phase butanolique, A = phase aqueuse .

On peut conclure de cette expérience que les ions Ag^+ sont capables de précipiter la majeure partie des cytokinines des graines immatures d'okra. Nous avons entrepris quelques expériences complémentaires pour préciser les modalités d'emploi de cette méthode .

b) Précipitation en milieu aqueux ou méthanolique. - Tout d'abord, nous avons cherché à préciser si la précipitation des produits actifs était aussi bonne en milieu méthanolique qu'en milieu aqueux .

400 g de tubercules de topinambour ont été traités avec 1,5 l de méthanol absolu. L'extrait a été divisé en 2 parties égales. Le méthanol de la première a été évaporé sous pression réduite, le résidu a été repris par l'eau. La précipitation à l'argent a été effectuée avec cet extrait aqueux. La deuxième moitié de l'extrait brut a été employée directement pour la précipitation à l'argent, précipitation qui a donc eu lieu en milieu méthanolique contenant environ 85 % d'eau provenant des tissus eux-mêmes .

Après élimination de l'argent par HCl , chacun des deux extraits a été traité ensuite à l'acétate d'éthyle, qui est capable de retirer des cytokinines à partir d'une solution aqueuse comme l'ont montré Nitsch et Nitsch (1955), dans le cas du jus de tomates. Nous avons effectué cette extraction d'abord à pH 3,0 puis à pH 8,3. Le résultat de ces expériences est présenté dans la figure 12. On voit que, dans les deux cas, l'argent a précipité des cytokinines. Les résultats sont assez voisins les uns des autres pour que l'on puisse conclure qu'il n'est pas nécessaire d'éliminer le méthanol d'un extrait méthanolique aqueux pour obtenir une précipitation satisfaisante des cytokinines à l'argent .

c) Effet d'une acidification sur l'efficacité de la précipitation par l'argent. - Les ions Ag^+ forment des complexes avec les pyrimidines aussi bien qu'avec les purines. Cependant, il est possible de précipiter les purines sans les pyrimidines en opérant en milieu acide. Les complexes Ag-pyrimidines restent en solution aux pH acides, alors que les complexes Ag-purines précipitent (Kerr et coll. 1949) .

Pour voir si le pH du milieu de précipitation avait une influence sur l'activité biologique, nous avons effectué l'expérience suivante :

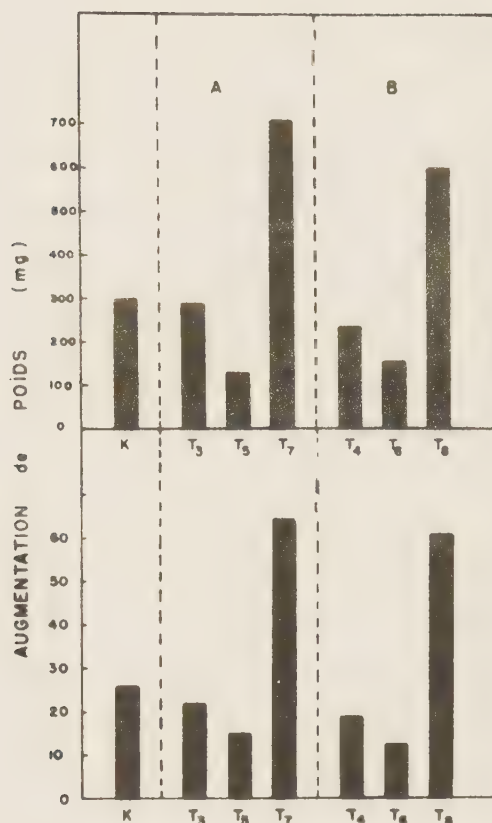


Fig. 12 - Précipitation des cytokinines par l'argent soit en milieu aqueux (A), soit en milieu méthanolique (B) .

Extrait de tubercules de topinambour effectué avec le méthanol à froid. La concentration finale dans les milieux de culture correspond à 800 g de tubercules frais par litre de milieu .

T₃ = extraits à l'acétate d'éthyle à pH 3,0 de l'extrait A

T₅ = " " " " à pH 8,3 " "

T₇ = fractions aqueuses restant après les extractions à l'acétate d'éthyle de A .

T₄ = extraits à l'acétate d'éthyle à pH 3,0 de l'extrait B

T₆ = " " " " à pH 8,3 " "

T₈ = fractions aqueuses restant après les extractions à l'acétate d'éthyle de B

K = témoins avec kinétine (5×10^{-7} M) .

En ordonnées : augmentations de poids des explantats calibrés de moelle de tabac. Poids de matière fraîche (en haut) et sèche (en bas).

600 g de tubercules frais de topinambour (var. "D-19") ont été broyés dans 1 litre de méthanol absolu. Après filtration du premier jus, l'opération a été répétée deux fois avec 300 ml + 300 ml de méthanol absolu. Le volume total de l'extrait a été ajusté à 1,8 l avec du méthanol absolu.

Un sixième de cet extrait brut, soit 300 ml, a été acidifié à pH 2,8 avec de l'acide formique avant de subir le traitement aux ions Ag^+ . Un autre sixième de l'extrait brut a subi la précipitation directement, sans que son pH naturel (de 7,3) ait été préalablement abaissé. Le résultat de cette expérience est présenté dans la figure 13 : on voit que, dans les deux cas, le test moelle de tabac a révélé une activité de cytokinine, activité qui serait même légèrement supérieure dans le cas de la précipitation effectuée au pH naturel.

d) Conclusions. - On peut conclure de ces diverses expériences que la précipitation par les ions Ag^+ constitue une bonne méthode de purification des cytokinines, que cette précipitation peut s'effectuer au pH naturel de l'extrait aussi bien qu'à pH 2,8, et que, dans le cas d'un extrait méthanolique aqueux, il n'est pas nécessaire d'éliminer le méthanol au préalable.

2. Précipitation par le baryum.

Principe : Les composés phosphorylés forment des sels de baryum qui précipitent ou restent en solution suivant le pH du milieu. Tous les composés phosphorylés-baryum précipitent à pH supérieur à 7.

Au cours d'expériences sur les cytokinines de la racine d'endive, il est apparu que, lors des traitements de l'extrait aqueux au butanol (voir plus loin fig. 18) une proportion importante d'activité biologique restait dans la phase aqueuse. Cette observation suggère que l'extrait de racines d'endive contient des cytokinines sous forme de ribosides ou ribotides. Dans ce dernier cas, la présence d'un groupement phosphorylé donne un nouveau moyen de précipiter sélectivement le composé avec les ions Ba^{++} . Nous avons donc recherché s'il était possible de précipiter par le baryum des cytokinines de la racine d'endive.

Des racines fraîches d'endive (500 g) ont été broyées avec 1 l de

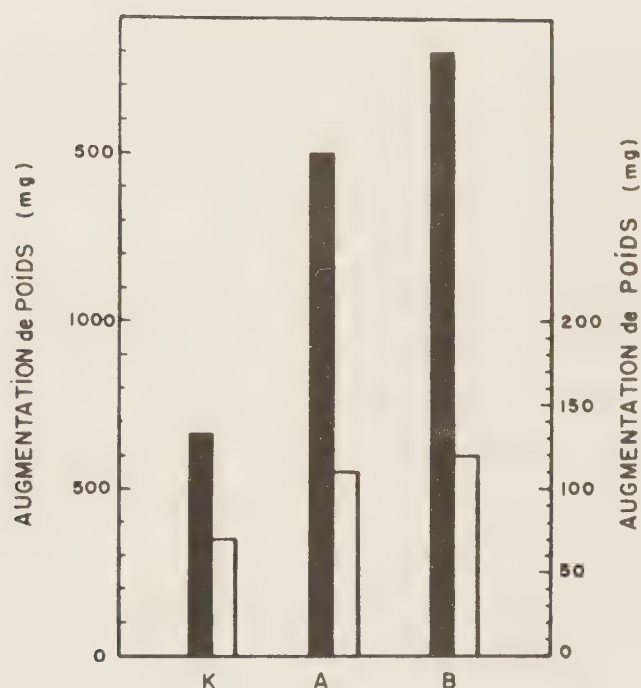


Fig. 13 - Précipitation par l'argent à pH différents .

Test moelle de tabac .

Cytokinines de tubercules frais de topinambour (équivalent de 400 g par litre de milieu final) précipitées par l'argent à pH 2,8 (A) ou à pH de 7,3 (B).

K = témoin avec kinétine (5×10^{-7} M) .

Les barres noires correspondent aux augmentations moyennes de poids de 12 explantats frais de moelle de tabac et les barres blanches aux augmentations de poids de matière sèche .

méthanol absolu. L'opération a été répétée 2 fois avec 200 ml de méthanol frais chaque fois et le volume de l'extrait ajusté à 1,5 l avec du méthanol. Le pH naturel de l'extrait est supérieur à 8. On a alors ajouté 150 ml d'eau distillée contenant 50 g d'acétate de baryum. Un précipité s'est formé. Il a été séparé par centrifugation.

Après lavage au méthanol, ce précipité a été dispersé dans 100 ml d'eau distillée. Le baryum a été enlevé par l'addition d'une solution aqueuse saturée de SO_4Na_2 qui a provoqué la précipitation de sulfate de baryum, lequel a été éliminé par centrifugation.

Les 2 fractions ainsi obtenues, celle qui avait été précipitée par les ions Ba^{++} et celle qui n'avait pas été précipitée, ont été ensuite purifiées, puis avant par précipitation aux ions Ag^+ puis extraction au butanol secondaire. Les résultats obtenus sont consignés dans le Tableau IV : on voit que toute l'activité biologique se trouve dans la fraction précipitable au baryum, ce qui indique la présence dans cet échantillon de racines d'endive (qui avaient été conservées 6 mois à 0°C) de cytokinines phosphorylées.

B - Méthodes physiques.

1. Adsorption sur charbon actif. - J. P. et C. Nitsch ont employé le charbon actif pour purifier un grand nombre d'extraits naturels contenant des cytokinines : jus de tomate (1960), extraits de tubercules de topinambour (1960), de cambium de peuplier (1965b), et sève de vigne (1965a). Le principe consiste à ajouter une quantité minimum de charbon actif finement pulvérisé à une solution aqueuse de l'extrait. On filtre sur terre d'infusoires, puis on élue le charbon avec un solvant approprié. Nitsch et Nitsch ont trouvé que le méthanol éluait une quantité notable de cytokinines, mais que cette quantité pouvait être accrue si l'on ajoutait de l'ammoniaque au méthanol. De plus, ils ont montré que la diéthylamine était capable d'éluer des cytokinines même après une première élution au méthanol (1965b).

Depuis, d'autres auteurs ont employé le charbon actif, par exemple, Koor (1964) dans le cas du lait de coco (le charbon était partiellement désactivé par l'acide stéarique), ou Koshimizu et coll. (1967) dans l'extraction de la dihydrozéatine à partir de graines immatures de lupin.

TABLEAU IV - PRECIPITATION PAR LE BARYUM DES PRINCIPES
ACTIFS D'UN EXTRAIT METHANOLIQUE DE
RACINES D'ENDIVE (D'APRES NITSCH, BUI et
C. NITSCH, 1966).

Test moelle de tabac (12 cultures par série). Résultats après 6 semaines.
Concentration en g de racines fraîches par litre de milieu final .

<u>milieu</u>	<u>degré de prolifération</u>
Témoin + kinétine (0,1 mg/l) :	++
<u>Précipité</u> au baryum, après élimination des ions Ba^{++} :	
A. Fraction brute (éq. 400 g/l) :	+
B. Après purification aux ions Ag^{+} :	
1) fraction brute (éq. 176 g/l) :	+
2) après fractionnement au butanol secondaire :	
a) phase aqueuse (éq. 156 g/l) :	++
b) phase butanolique (éq. 176 g/l) :	0
<u>Surnageant</u> , après purification aux ions Ag^{+} :	
1) fraction brute (éq. 200 g/l) :	0
2) après fractionnement au butanol secondaire :	
a) phase aqueuse (éq. 200 g/l) :	0
b) phase butanolique (éq. 200 g/l) :	0

A titre d'exemples, nous allons présenter trois expériences dans lesquelles nous avons employé le charbon actif pour purifier des extraits contenant des cytokinines .

a) Expérience 1 : Purification d'un extrait brut de graines d'okra. - Trois grammes de graines immatures d'okra lyophilisées ont été traités trois fois à l'eau bouillante. Une partie de cet extrait brut a été employée directement pour le test moelle de tabac. A une autre partie de l'extrait (50 ml) correspondant à 1 g de matériel sec, on a ajouté 100 mg de charbon actif (provenant de la firme Touzart & Matignon). Après avoir bien mélangé le tout pendant quelques minutes, le mélange a été filtré sur un lit de terre d'infusoires lavée et disposée sur un papier filtre reposant sur le fond d'un entonnoir Buchner. On a ainsi obtenu un filtrat F, d'une part, et le charbon sur la terre d'infusoires, d'autre part. Ce charbon a été élué au méthanol absolu bouillant (chauffé au bain-marie). Cet éluat M a été évaporé à sec, puis repris par 50 ml d'eau distillée. Enfin le charbon a été élué à la diéthylamine (éluat D) qui a ensuite été évaporé sous pression réduite, le résidu étant repris par 50 ml d'eau. Les pH de toutes ces fractions ont été ajustés à 5,5 avec HCl ou NaOH. Les différents extraits ont été incorporés au milieu de base. Les résultats fournis par le test moelle de tabac sont présentés dans la figure 15. On voit que, après action du charbon actif, le filtrat F restant a perdu la plus grande partie de l'activité biologique que possédait l'extrait brut (EB). L'activité biologique disparue se retrouve dans l'éluat au méthanol bouillant (M) qui semble avoir retiré du charbon la majeure partie des cytokinines. L'extrait à la diéthylamine, venant après le méthanol, n'a eu qu'une faible activité biologique (D) .

b) Expérience 2 : Extrait purifié de graines immatures d'okra. - Une expérience analogue a été réalisée avec un extrait de graines immatures d'okra déjà purifié par précipitation à l'argent et par partage entre eau et butanol secondaire .

Dans ce cas, comme le montrent les résultats de la figure 16, l'élution du charbon par la diéthylamine a toujours donné des résultats supérieurs à l'élution par le méthanol bouillant .

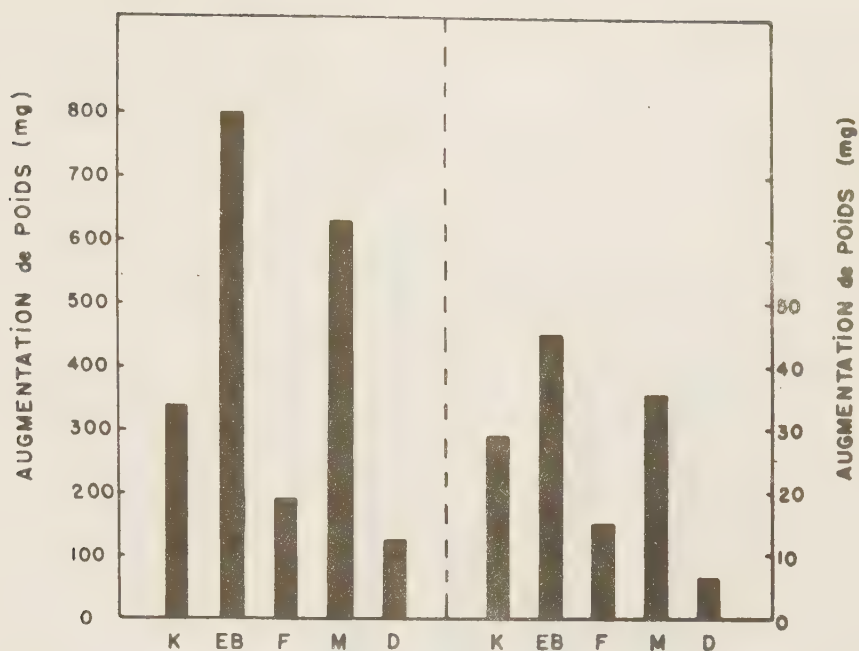


Fig. 15 - Fractionnement d'un extrait aqueux de graines immatures d'okra par adsorption sur charbon actif.
 K = témoins avec kinétine (5×10^{-7} M), EB = extrait brut, F = filtrat de l'extrait brut après traitement au charbon, M = éluat du charbon au méthanol, D = éluat à la diéthylamine.
 En ordonnées : augmentations moyennes de poids de matière fraîche (à gauche) et sèche (à droite) des cals de moelle de tabac.

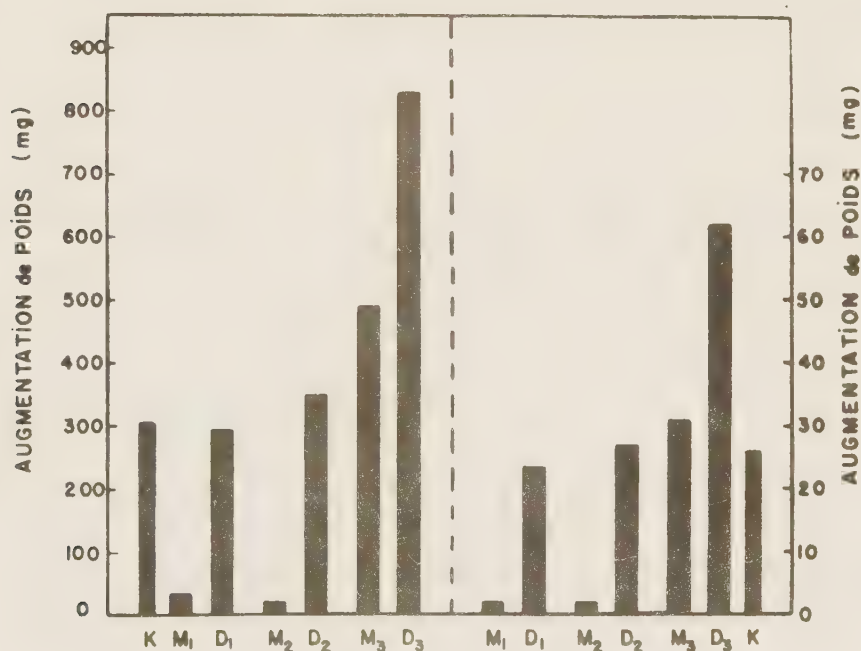


Fig. 16 - Purification au charbon actif des diverses fractions provenant d'un extrait de graines immatures d'okra.
 K = témoins avec kinétine (5×10^{-7} M), M₁, M₂, M₃ = éluats au méthanol de fractions appelées 1, 2 et 3 ; D₁, D₂, D₃ = éluats à la diéthylamine des mêmes fractions, après passage du méthanol.
 En ordonnées : augmentations moyennes de poids de matière fraîche (à gauche) et sèche (à droite) des cals de moelle de tabac.

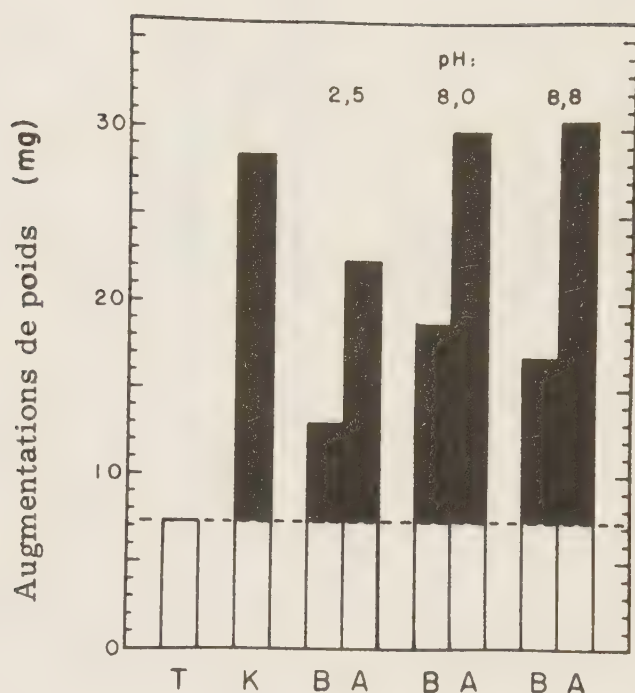


Fig. 18 - Effet du pH sur le partage des cytokinines de la racine d'endive entre butanol secondaire et eau .

T = témoins sans cytokinine .

K = " avec kinétine (5×10^{-7} M) .

B = fractions butanoliques .

A = fractions aqueuses .

La concentration en extrait des milieux de culture correspond à 320 g/l de racines fraîches .

En ordonnées : Augmentations de poids (moyenne de 12) des explantats secs de moelle de tabac. (Daprès Nitsch, Bui et C. Nitsch, 1966) .

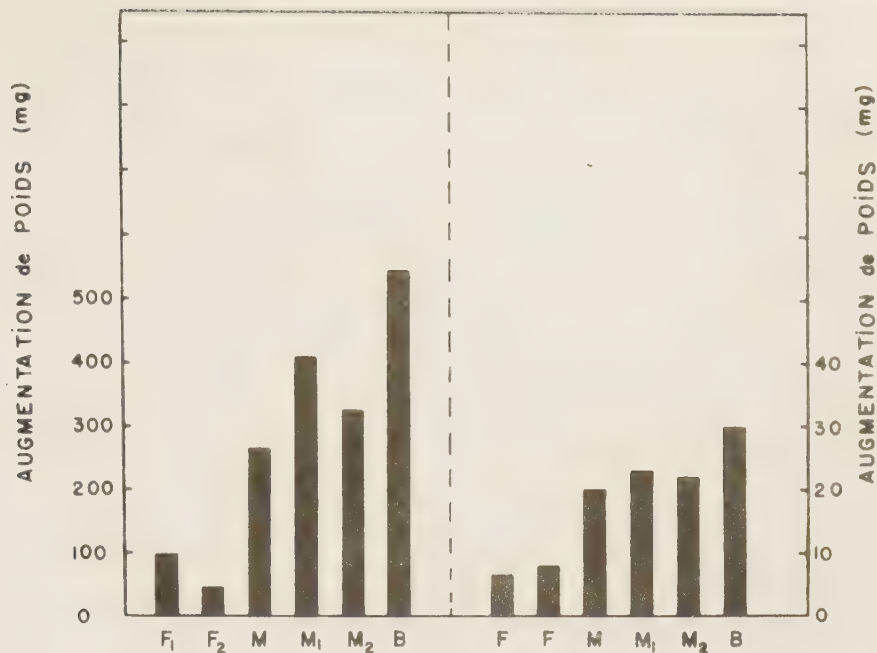


Fig. 17 - Purification des cytokinines du topinambour par le charbon actif. L'extract des tubercules, effectué à l'eau bouillante (20 min. à l'autoclave), a été acidifié à pH 3,0 avec HCl et agité avec du charbon actif (5 g pour 800 g de tubercules frais), et filtré. Le filtrat a été séparé en deux fractions par agitation avec de l'acétate d'éthyle : F₁ = phase acétate d'éthyle, F₂ = phase aqueuse. Le charbon a été élué avec du méthanol bouillant (M), puis avec du benzène (B). Un échantillon de la fraction M a été séparé en deux fractions après évaporation du méthanol : une fraction acétate d'éthyle (M₁) et une fraction aqueuse (M₂). En ordonnées : augmentations moyennes de poids des explantats de moelle de tabac, frais (à gauche) et secs (à droite).

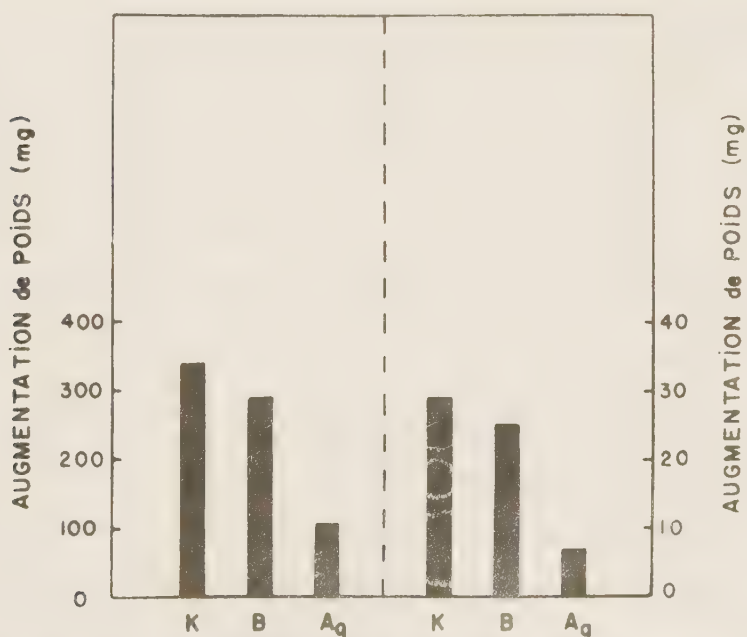


Fig. 19 - Extraction des cytokinines de graines immatures d'okra au butanol secondaire à partir d'une solution aqueuse. K = témoins avec kinétine ($5 \times 10^{-7}M$) ; B : phase butanolique d'un extrait préalablement purifié à l'argent et correspondant à 4 g de graines lyophilisées par litre de milieu de culture. A_q = phase aqueuse. En ordonnées : augmentations moyennes de poids des explantats de moelle de tabac, frais (à gauche) et secs (à droite).

On peut donc conclure que la diéthylamine constitue un éluant de choix pour les cytokinines adsorbées au charbon actif .

c) Expérience 3 : Elution par le benzène d'un extrait de tubercules de topinambour. - Dans une troisième expérience, nous avons mélangé 5 g de charbon actif à un extrait aqueux de 800 g de tubercules de topinambour obtenu par chauffage de ces derniers avec 400 ml d'eau distillée. Les tubercules avaient ensuite été broyées à chaud et traitées avec 400 ml d'eau bouillante supplémentaire. Après refroidissement et filtration, le pH de l'extrait avait été ajusté à 3,0 avec de l'acide chlorhydrique. Après agitation du charbon avec l'extrait aqueux pendant 15 min. environ, le tout a été filtré sur terre d'infusoires lavée à l'eau. Le filtrat ne s'est pas montré actif au test moelle de tabac, même avec un fractionnement supplémentaire à l'acétate d'éthyle (fig. 17 : F₁ et F₂). Par contre, le charbon a libéré une grande activité biologique après élution au méthanol bouillant (fig. 17 : M). Cette fraction a pu être subdivisée en deux par un fractionnement supplémentaire à l'acétate d'éthyle (M₁ et M₂). Mais le méthanol bouillant n'a pas retiré toute l'activité du charbon actif puisque une extraction au benzène après le méthanol a encore une très forte activité (B) .

d) Conclusions. - Nous pouvons conclure de ces essais que le charbon actif peut retirer d'un extrait aqueux les cytokinines naturelles qui s'y trouvent. On peut ensuite éluer ces cytokinines par le méthanol absolu bouillant, suivi par d'autres solvants organiques comme la diéthylamine ou le benzène, lesquels sont capables de retirer du charbon de grandes quantités de cytokinines même après une première élution au méthanol .

2. Partage entre liquides non miscibles. - Il est possible d'extraire certaines cytokinines à partir des solutions aqueuses dans lesquelles elles se trouvent au moyen de certains solvants organiques non miscibles à l'eau. Au cours de nos expériences, nous avons employé l'acétate d'éthyle et le butanol secondaire .

a) Emploi d'acétate d'éthyle. - L'acétate d'éthyle a été

employé par Nitsch et Nitsch (1955) pour purifier le principe à activité de cytokinine du jus de tomate. Nous avons employé cette technique dans la purification de l'extrait d'endive qui a donné un bon résultat comme le montrera la 2ème Partie .

b) Emploi du butanol secondaire. - Le n-butanol a été employé par Miller (1965) pour retirer la zéatine et son riboside du lait de maïs .

Dans le but d'avoir un solvant un peu plus volatil que le n-butanol (qui bout à 117°C), Nitsch et coll. (1966) ont employé le butanol secondaire (qui bout à 100°C). Ce solvant nous a donné des résultats divers dont voici quelques exemplaires :

1) Le pH d'un extrait aqueux de graines d'okra a été ajusté à 7,0 avec NaOH, puis cette fraction a été traitée 3 fois au butanol secondaire. Les résultats de la figure 19 montrent que la majeure partie de l'activité biologique est passée dans la phase butanolique, cependant la phase aqueuse garde encore un peu de principes actifs .

2) L'extrait d'endive qui a été traité à l'acétate d'éthyle (à pH 3) a été traité ensuite au butanol secondaire (à pH 8) qui a enlevé toute l'activité biologique de la phase aqueuse (fig. 23) .

3) Chromatographie sur couches minces. - Des études préliminaires ont été réalisées avec des plaques de cellulose, de polyamide et de silicagel selon les techniques habituelles (voir Stahl, 1958) avec diverses cytokinines et composés voisins (environ 5µg par substances). La révélation a été faite à la lumière ultraviolette (254 nm) .

Après avoir essayé divers adsorbants et divers solvants, nous avons conclu que le meilleur adsorbant était la cellulose avec, comme solvant, soit l'eau pure, soit le butanol secondaire à 75 %. Les résultats obtenus avec ces deux solvants sont consignés dans le Tableau V. Comme les Rf peuvent varier d'une expérience à l'autre quand il s'agit de couches minces, il est bon d'exprimer les Rf en fonction d'une substance de

TABLEAU V - Rf DES CYTOKININES ET CORPS VOISINS SUR PLAQUES DE CELLULOSE

Composés	H ₂ O 100 %						Butanol secondaire 75 %					
	1ère exp.		2ème exp.		3ème exp.		1ère exp.		2ème exp.		3ème exp.	
	Rf	R _{ad}	Rf	R _{ad}	Rf	R _{ad}	Rf	R _{ad}	Rf	R _{ad}	Rf	R _{ad}
<u>Bases :</u>												
Adénine	0,39	1,00	0,38	1,00	0,29	1,00	0,50	1,00	0,55	1,00	0,56	1,00
Cytosine			0,80	2,10	0,79	2,72					0,38	0,67
Uracile					0,80	2,75			0,57	1,04		0,51
Thymine			0,74	1,94							0,59	1,05
Triacanthine	0,44	1,13					0,61	1,22	0,63	1,15		
Zéatine	0,54	1,39	0,55	1,44					0,85	1,55	0,68	1,22
Kinétine	0,52	1,33					0,83	1,66	0,93	1,69		
6-benzyladénine	0,46	1,18					0,88	1,76	0,95	1,73		
<u>Nucleosides :</u>												
Adénosine	0,59	1,51					0,50	1,00				
Guanosine	0,68	1,74										
SD-8339	0,60	1,53			0,56	1,93	0,95	1,90	0,98	1,79	0,34	0,61
<u>Nucléotides :</u>												
Acide adénylique	0,94	2,41	0,97	2,55			0,17	0,34			0,15	1,27
Ac. guanylique	0,96	2,46									0,13	0,24
Ac. thymidilique			0,96	2,52							0,09	0,16
Ac. Cytidylique												
Ac. uridylique							0,18	0,36				

référence. C'est pourquoi nous avons donné non seulement les Rf bruts, mais aussi les Rf par rapport à l'adénine (R_{ad}).

A titre d'exemple de l'emploi de la chromatographie en couches minces pour la purification d'extraits naturels, nous allons présenter des résultats obtenus avec la sève de vigne. Loeffler et Van Overbeek (1964) ont montré que la sève de vigne récoltée au printemps contient des substances qui retardent le jaunissement des feuilles détachées de radis. Nitsch et Nitsch (1965a) ont précisé que ces substances étaient actives sur le test moelle de tabac et qu'elles pouvaient être extraites de la sève par le charbon actif. Nous avons précipité les cytokinines de la sève par l'argent. Cet extrait purifié a ensuite été chromatographié sur plaques de cellulose. L'eau pure n'avait pas donné de bons résultats (2 zones absorbant à 254 nm) l'une au Rf 0,0, l'autre au front du solvant). Par contre, le mélange méthanol (40) + acide acétique (10) + H_2O (10) a séparé 3 zones absorbant à 254 nm aux Rf suivants :

Zone A : Rf 0,76 - 0,86

Zone B : Rf 0,43 - 0,57

Zone C : Rf 0,25 - 0,36

Ces 3 zones ont été éluées et incorporées aux milieux de culture pour moelle de tabac. Ainsi que le montrent les résultats de la figure 20, à une dose correspondant à 400 ml de sève brute par litre de milieu, la zone A a montré une forte activité de cytokinine, la zone B une activité plus faible, alors que la zone C était pratiquement inactive.

Des précisions supplémentaires sur la nature des cytokinines de la sève de vigne ont pu être obtenues grâce à l'emploi de pellicules enduites de cellulose.

4. Chromatographie sur pellicules . - Au lieu de verre comme support (cas de la chromatographie sur plaques), les pellicules emploient un support plastique. Les pellicules recouvertes de cellulose que nous avons employées étaient les pellicule "MN Polygram Cel 300" fabriquées par Macherey-Nagel & Co., Düren, Allemagne. Divers solvants ont été employés (eau pure, différentes proportions de butanol et d'eau, adjonction d'ammoniaque, d'acide formique, etc.). Les meilleurs résultats ont été obtenus avec l'eau pure et le butanol secondaire à 5 %.

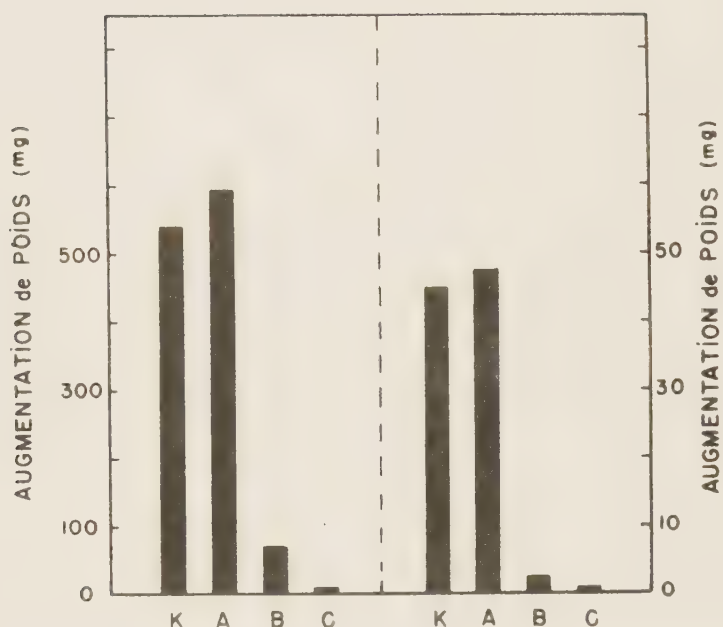


Fig. 20 - Test moelle de tabac de trois bandes séparées par chromatographie sur couche mince de cellulose à partir d'un extrait de sève de vigne (préalablement purifié par précipitation à l'argent) .

Chromatographie dans le mélange méthanol (40) + acide acétique (10) + eau (10) .

K = témoins avec kinétine (5×10^{-7} M) .

A = bande de Rf 0,76 à 0,86

B = " 0,43 à 0,57

C = " 0,25 à 0,36

En ordonnées : augmentations moyennes de poids des explantats de moelle de tabac, frais (à gauche) et secs (à droite) .

Les résultats obtenus avec l'eau pure et le butanol secondaire à 5 % sont consignés dans le Tableau VI .

Nous avons appliqué la technique de chromatographie sur pellicule au cas des cytokinines de la sève de vigne. Au cours d'une première chromatographie dans l'eau pure (sur pellicule préalablement lavée à l'eau), nous avons obtenu 2 taches visibles aux rayons ultra-violet à 254 nm). Les Rf de ces taches étaient nettement plus importants que ceux de cytokinines témoins comme l'isopentenyladénine, la zéatine et la dihydrozéatine, ou même des ribosides correspondants (Tableau VI). Nous avons alors essayé un autre solvant de chromatographie , proposé par Miller (1965) pour séparer les ribosides des bases correspondantes : de l'acide borique (0,03 M dont le pH avait été ajusté à 8,4 avec NaOH. Les Rf obtenus avec l'extrait de sève de vigne et diverses substances connues sont consignés dans le Tableau VII .

IV. CONCLUSIONS

A - Présence de cytokinines dans des matériels divers .

Au cours de cette Première Partie, nous avons exposé un grand nombre d'expériences effectuées sur des matériels différents. Ces essais ont permis de mettre en évidence des cytokinines dans :

1) les graines immatures d'okra, le maximum d'activité ayant lieu 5 jours après la pollinisation (fig. 8) .

2) les tubercules de topinambour, où nous avons confirmé que l'activité trouvée par Nitsch et Nitsch (1960) après chauffage du matériel existait bien lorsqu'on procédait par une extraction à froid au moyen de méthanol .

3) les racines d'endive, confirmant ainsi le travail de Vardjan et Nitsch (1961) .

4) la sève de vigne ,

5) les graines immatures de pois, comme l'avaient démontré Rogozinska et coll. (1965) .

A cette liste, il faudrait ajouter les fruits immatures de concombres et les feuilles de tabac "Wisconsin 38" qui ont donné des résultats positifs avec le test moelle de tabac. Il est donc évident que les cytokinines se trouvent dans toutes sortes de tissus (graines, fruits, feuilles, tubercules, racines, sève brute) et que la liste donnée dans le Tableau II s'augmentera vraisemblablement d'année en année .

B - Une méthode d'extraction et de purification des cytokinines naturelles .

Le but des essais présentés dans la 1ère Partie était de mettre au point une méthode d'extraction et de purification des cytokinines naturelles. Les possibilités qui se dégagent de nos résultats sont les suivantes :

En ce qui concerne l'extraction, il semble que ce soient l'eau bouillante ou le méthanol aqueux qui permettent l'extraction la plus totale. Ceci résulte de l'existence des cytokinines naturelles sous forme de bases libres, de ribosides ou de ribotides, lesquels sont très solubles dans l'eau .

Pour retirer les produits actifs des solutions aqueuses ainsi obtenues, on peut employer des méthodes chimiques et physiques. Les premières consistent principalement en une précipitation par les métaux lourds, les ions Ag^+ donnant des résultats particulièrement réguliers. Lorsqu'il s'agit de ribotides, on peut employer une précipitation aux ions Ba^{++} .

En ce qui concerne les méthodes physiques, l'adsorption sur charbon actif suivi d'une élution par le méthanol absolu, ou, mieux encore, par la diéthylamine ou le benzène, a donné des résultats satisfaisants. Le partage entre liquides non miscibles, tels que l'eau et l'acétate d'éthyle ou le butanol secondaire, n'a pas permis de retirer toujours toutes les cytokinines de la phase aqueuse, probablement à cause de la présence de ribotides. La chromatographie sur couches

minces de cellulose enfin, et sa variante sur pellicule que nous avons spécialement étudiée, ont permis de purifier plus avant les fractions actives.

Ayant une technique satisfaisante nous allons l'appliquer à un cas particulier, l'extraction et l'identification d'une cytokinine de la racine d'endive, travail qui sera présenté au cours de la 2ème Partie .

TABLEAU VI - Rf DES CYTOKINES ET CORPS VOISINS SUR PELLICULES DE CELLULOSE MN-CEL 300

[illegible]

TABLEAU VII - CHROMATOGRAPHIE DES CYTOKININES EXTRAITES
DE LA SEVE DE VIGNE SUR PELLICULES DE
CELLULOSE MN Cel-300

Substances	Rf dans les solvants :	
	H ₂ O (100 %)	Tampon borate ^(a)
Isopentenyladénine	0,28	0,32
Zéatine	0,37	0,43
Dihydrozéatine	0,48	0,50
IPA-riboside	0,50	0,76
Zéatine-riboside	0,65	0,87
Sève de vigne	{ 0,70 0,85	0,78 ^(b)
Adénine	-	0,35
Adénosine	-	0,74
Ac. adénylique	-	0,93 ^(b)

(a) Ac. borique (0,03M) dont le pH est ajusté à 8,4 avec NaOH.

(b) Réaction positive au réactif molybdique pour les phosphates.

IIème PARTIE

ISOLEMENT D'UNE CYTOKININE DE LA RACINE D'ENDIVE.

I - INTRODUCTION

Après avoir étudié l'efficacité de diverses techniques, nous avons cherché à les appliquer à un cas précis, celui de la racine d'endive .

A - Propriétés de bourgeonnement de la racine d'endive .

La variété "Reine des Halles" de l'endive, Cichorium intybus L. , possède à un degré inhabituel le pouvoir de régénérer des bourgeons, soit à partir de fragments de racines, soit à partir de fragments de feuilles (Toponi, 1963 ; Nitsch et Nitsch, 1964). Cette propriété a été mise à profit par de nombreux chercheurs pour étudier, notamment, la polarité de la régénération des bourgeons (Schouteden-Wery, 1920 ; Gautheret, 1941; Warmke et Warmke, 1950), l'action histogène des bourgeons sur les tissus sous-jacents (Camus, 1949), la vernalisation in vitro (Paulet et Nitsch, 1964b ; Paulet, 1965 ; Margara, 1965), etc... L'origine histologique des bourgeons néoformés a été précisée par Buvat (1944-45) .

Or, parmi les substances capables de provoquer la néoformation de bourgeons se trouvent l'adénine (Skoog et Tsui, 1948), et surtout, les cytokinines comme la kinétine (Skoog et Miller, 1957). On pouvait donc se demander si la racine d'endive n'était pas particulièrement riche en cytokinines .

B - Présence de cytokinines dans la racine d'endive .

Au cours de leurs expériences sur la polarité de la racine d'endive, Vardjan et Nitsch (1961) ont montré que, non seulement il y avait

des gradients auxiniques entre les extrémités apicales et basales des boutures, mais, en plus, des fluctuations dans le niveau de substances de type cytokinine. Depuis, Nitsch, Bui et Nitsch (1966) ont précisé qu'il existait, dans la racine d'endive un principe à activité de cytokinine capable de stimuler le bourgeonnement chez les cultures de moelle de tabac. Nous avons donc cherché à isoler et à identifier chimiquement la cytokinine de la racine d'endive .

II - EXTRACTION

A - Extraction en masse .

Des racines d'endive (250 kg) fraîchement récoltées en novembre ont été pelées, coupées en morceaux et plongées immédiatement dans du méthanol absolu. Le tout a été conservé à 3°C puis broyé par un "mixer" mécanique. Après broyage, la pulpe a été traitée trois fois au méthanol à 3°C. L'extrait méthanolique a été séparé de la pulpe dans uneessoreuse. Les phases liquides obtenues ont été réunies, puis concentrées sous vide partiel à 30°C jusqu'à obtention d'une consistance sirupeuse : 25 litres d'extrait concentré ont été obtenus à partir de 250 kg de racines fraîches.

B - Activité de l'extrait brut, Effet du mode de stérilisation .

Des quantités d'extrait brut correspondant à 10, 30, 100, 200, 300 et 400 g de matériel frais ont été incorporées à 1 litre de milieu. On sait que l'acide désoxyribonucléique (ADN) (Hall et de Ropp, 1955), qui n'a pas d'activité de cytokinine par lui-même, donne après chauffage des produits de dégradation actifs sur le test moelle de tabac. C'est pourquoi nous avons effectué deux expériences parallèles : dans l'une, l'extrait brut a été stérilisé par la vapeur à 120°C avec le milieu, dans l'autre, il a été stérilisé par filtration .

Les résultats de cette expérience (fig. 21) sont concluants : à toutes les concentrations, la croissance des explantats de moelle de tabac a été pratiquement la même, que l'extrait ait été chauffé ou stérilisé par filtration. On peut en conclure que l'activité de cytokinine de l'extrait n'est pas due à un produit qui serait formé durant la stérilisation par la

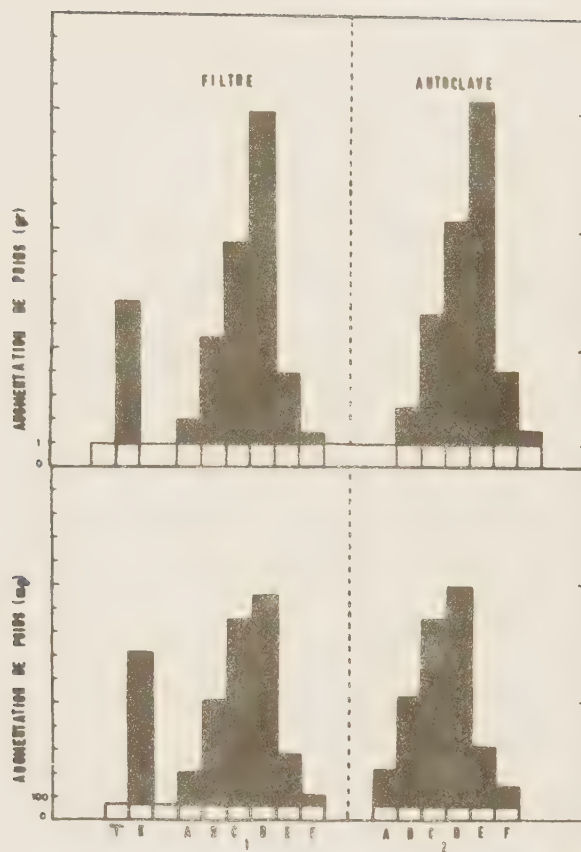


Fig. 21 - Effet du mode de stérilisation des extraits de racines d'endives :
 Extraits filtrés à gauche, chauffés à 120° à droite .
 T = témoin sans cytokinine .
 K = " avec kinétine (5×10^{-7} M) .
 Equivalents de (A) 10 g, (B) 30 g, (C) 100 g, (D) 200 g, (E) 300 g,
 (F) 400 g de racines fraîches par litre de milieu de culture .
 En ordonnées : augmentations moyennes de poids des
 explantats de moelle de tabac , frais (en haut) et secs (en bas) .

vapeur. En conséquence, nous avons, pour la suite des recherches, employé la stérilisation à l'autoclave qui est plus commode. D'autre part, les résultats de la figure 21 montrent que l'extrait brut d'endive a une forte activité biologique sur le test moelle de tabac, activité qui atteint son maximum pour la dose correspondant à 200 g de racines/l, soit 20 %, pour devenir rapidement inhibitrice au-delà .

III - PURIFICATION DE L'EXTRAIT BRUT .

A - Précipitation par la baryum .

Au cours d'expériences antérieures, Nitsch, Bui et Nitsch (1966) ont montré que l'adjonction d'acétate de baryum à un extrait au méthanol de racines fraîches précipitait la quasi totalité des cytokinines. Ces résultats sont rappelés plus haut (Tableau IV). Nous avons donc employé la précipitation aux ions Ba^{++} comme première étape de purification .

A l'extrait brut concentré a été ajoutée, par petites quantités, une solution d'acétate de baryum à la concentration 2M. Un abondant précipité blanc s'est formé. Après décantation, on a répété l'opération jusqu'à ce que l'addition d'acétate de baryum ne provoque plus de louche blanc. Pour 1 litre d'extrait brut concentré il a fallu au total 34 ml de solution d'acétate de baryum 2M. Après décantation finale (1 nuit à 3°C), le précipité a été séparé par filtration du liquide surnageant appelé S_1 : il s'est montré actif sur le test moelle de tabac (fig. 22) et a donc été conservé .

B - Etude de la fraction précipitée par les ions Ba^{++}

Le précipité a été mis en suspension dans de l'eau distillée. Les ions Ba^{++} ont été enlevés par l'adjonction d'ions SO_4^{--} qui ont été apportés par de l'acide sulfurique 0,5 N d'une part, du Na_2SO_4 (1 M) d'autre part. Il s'est alors formé un précipité de $BaSO_4$ insoluble qui a été éliminé par centrifugation pendant 15 min. à la vitesse de 3.000 tours/min .

1. Précipitation à l'argent. - Outre les composés phosphorylés, le baryum précipite aussi les phosphates minéraux. Nous avons donc procédé à une précipitation à l'argent pour ne retenir que les composés du type purines .

Après élimination du baryum, le pH de la solution (appelée S₂) a été ajusté à 3,5 avec de l'acide formique, puis on a ajouté par petites portions, une solution molaire d'AgNO₃. Après avoir laissé précipiter pendant 48 h à 3°C le complexe formé, nous avons séparé ce précipité P₁ du surnageant S₃ par centrifugation. Le précipité P₁ a été lavé deux fois à l'eau distillée. Puis il a été remis en suspension dans de l'eau et débarrassé des ions A_g⁺ par une solution de HCl (0.1 N). Après élimination par centrifugation de l'AgCl formé, on a gardé la solution correspondant au précipité P₁.

Le tableau VIII résume la suite des opérations effectuées, à la fin desquelles nous avons 3 fractions : S₁, S₃ et P₁. Le test moelle de tabac a révélé que seules les fractions S₁ et P₁ étaient actives (fig. 22) .

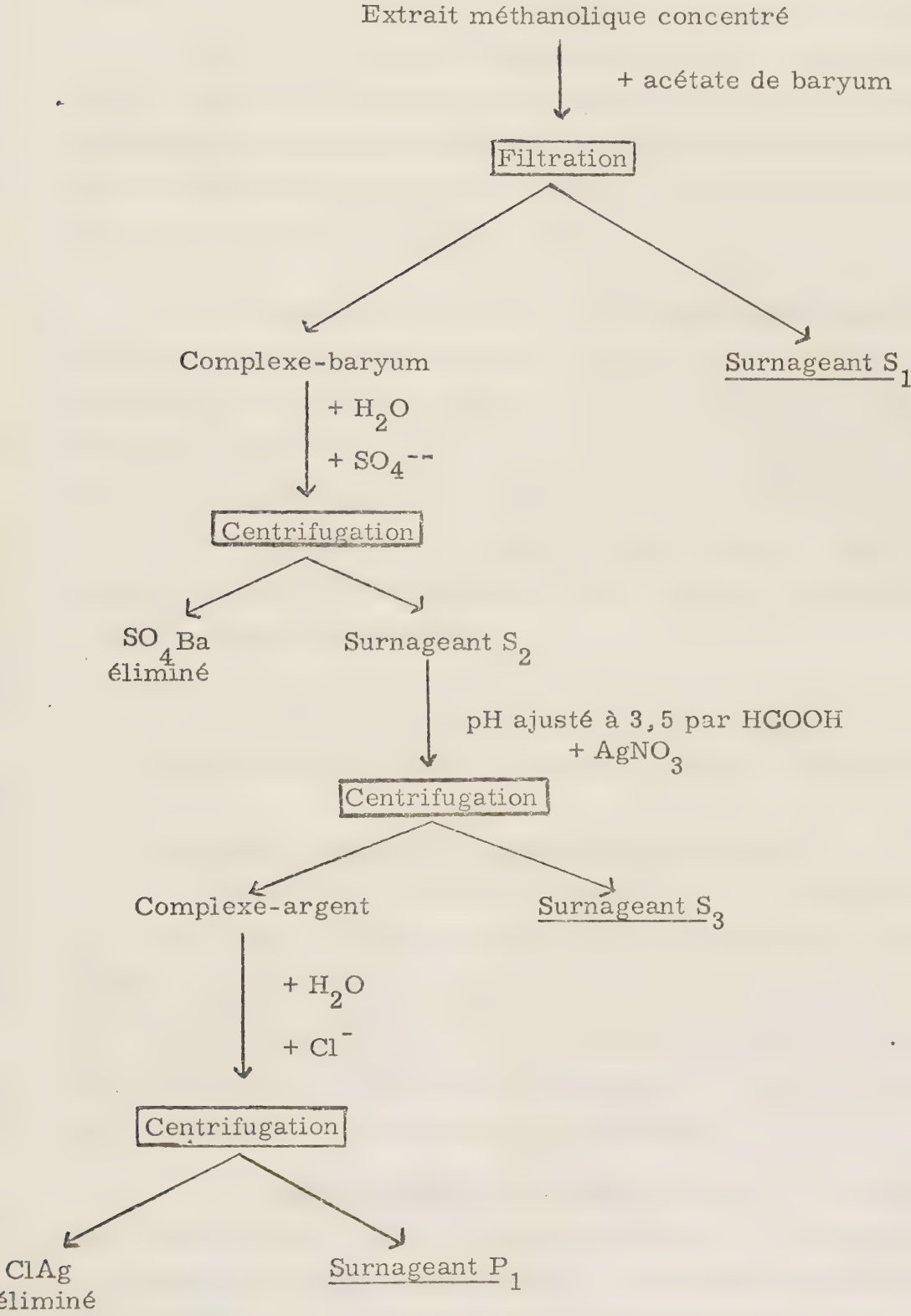
Les poids des cals formés par l'équivalent de 100 g de racines fraîches de diverses fractions sont comparés dans le tableau suivant avec les poids de ceux formés par 100 µg de kinétine par litre .

	Poids de matière fraîche	Poids de matière sèche	Equivalent kinétine
Extrait brut	9,50 g	850 mg	119 µg
P ₁	7,00 g	300 mg	75 µg
S ₁	6,00 g	400 mg	100 µg
100 µg k	5,00 g	400 mg	

L'activité de la fraction S₁ indique que, dans l'extrait brut des racines d'endive employées, toutes les cytokinines ne se trouvaient pas à l'état phosphorylé, contrairement au cas de l'expérience dont les résultats sont présentés dans le tableau IV .

2. Purification de la fraction P₁. - La fraction P₁, concentrée à 40°C sous vide partiel jusqu'à évaporation presque complète de l'eau, a fourni un liquide très épais de couleur foncée dont le pH a été ajusté à 7. Ce concentré a été chromatographié sur colonne de cellulose ET₁₁ (Whatman) préparée de la manière suivante :

TABLEAU VIII - RESUME DES PREMIERES ETAPES DE LA PURIFICATION
DES CYTOKININES DE LA RACINE D'ENDIVE.



La cellulose a d'abord été mise en contact avec HCl 0,5 N pendant une heure. Puis elle a été lavée avec de l'eau désionisée jusqu'à ce que le pH de l'eau de lavage soit égal à 5. Elle a ensuite été mise en contact avec NaOH 0,5 N pendant 1 heure, puis lavée à nouveau à l'eau jusqu'à pH 7. Avant l'emploi on faisait une suspension de la poudre ainsi activée dans de l'eau distillée, une agitation mécanique était nécessaire pour obtenir une parfaite homogénéité lors du remplissage de la colonne. Pour une colonne de 7,5 cm de diamètre et 65 cm de long, il a fallu 500 g de poudre sèche.

L'extract a été placé à la partie supérieure de la colonne. L'élution s'est faite d'abord avec 6 l d'eau distillée. Les 2 premières fractions de 1 l qui sont sorties de la colonne étaient incolores et de pH 11. Les fractions suivantes étaient jaune clair, jaune-rosé, et même rose foncé, le pH étant toujours 11. A la 6e fraction de 1 l, le pH est descendu à 7,1 et l'éluat est devenu incolore. On a alors continué l'élution avec 25 l d'HCl à 0,1 N. En tout, 31 fractions de 1 litre ont ainsi été recueillies.

Le test moelle de tabac a indiqué une faible activité biologique parmi les premières fractions et aucune dans les autres.

C - Etude de la fraction non précipitable aux ions Ba^{++} .

Ainsi que l'a montré l'expérience de la figure 22, la fraction S_1 , c'est-à-dire le liquide résiduel après la précipitation par le baryum, possède une forte activité biologique. Pour en extraire le principe actif, nous avons fait des essais avec des résines échangeuses d'ions, puis nous avons employé le partage entre deux liquides non miscibles, suivi de chromatographies répétées sur couches minces.

1. Chromatographie sur colonnes Dowex. - Les essais effectués avec deux types de résines échangeuses d'ions, la "Dowex 50 (x 8)" échangeuse de cations et la "Dowex G₁" échangeuse d'anions ont séparé, dans les deux cas, trois pics d'activité biologique (fig. 14).

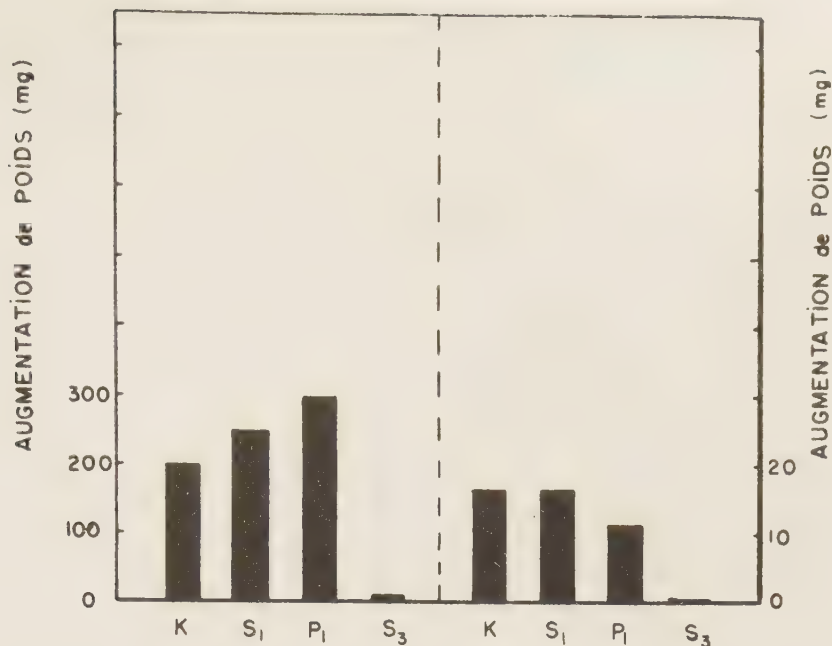


Fig. 22 - Activités biologiques des fractions d'extract de racines d'endive éprouvées par le test moelle de tabac .

K = témoin avec kinétine ($5 \times 10^{-7}M$), S₁ = fraction résiduelle après précipitation par le baryum, P₁ = fraction ayant précipité avec l'argent, S₃ = surnageant non précipitable par l'argent .
En ordonnées : augmentations moyennes de poids des explantats de moelle de tabac , frais (à gauche) et secs (à droite) .

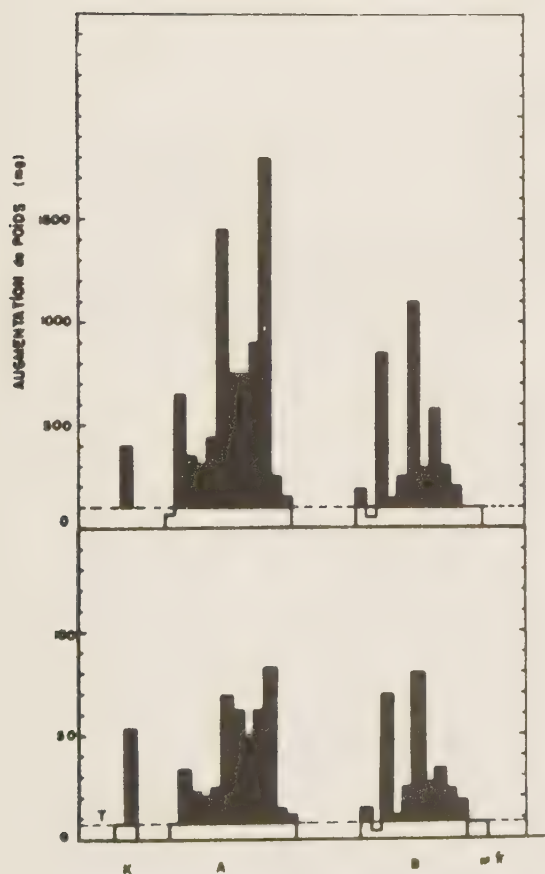


Fig. 14 - Activité biologique des fractions obtenues par élution d'une colonne de résine échangeuse de cations Dowex 50 (A) ou d'anions Dowex G₁ (B) .

Extrait S₁ de racines d'endive correspondant à 2,5 K de racines fraîches dans les deux cas. K = témoin avec kinétine ($5 \times 10^{-7}M$) .
En abscisses : fractions (12 fractions de 1 litre dans chaque cas). En ordonnées : augmentations moyennes de poids de cals frais (en haut) ou secs (en bas) de moelle de tabac .

2. Partage entre liquides non miscibles. - Nous avons ajusté à 3,0 le pH d'une partie de la fraction S_1 , puis l'avons traitée avec son volume d'acétate d'éthyle .

Cette opération a été répétée deux fois avec de l'acétate d'éthyle neuf. Après décantation et séparation des phases organiques et aqueuses, les trois fractions organiques ont été réunies et évaporées sous vide partiel à 25°C : elles constituent l'extrait acide .

Le pH de la phase aqueuse a été ramené à 8 avec une solution de soude normale, puis la phase aqueuse a été traitée avec trois portions de butanol secondaire. La phase butanolique ainsi obtenue constitue l'extrait alcalin .

La phase aqueuse restante a été concentrée sous vide pour évaporer toute trace de solvants organiques : elle est appelée extrait aqueux .

Ainsi l'extrait S_1 a été fractionné en 3 parties :

- extrait acide à l'acétate d'éthyle,
- extrait alcalin au butanol secondaire,
- extrait aqueux .

Ces extraits ont été essayés biologiquement de la manière suivante : l'équivalent de 152,5 g de racines fraîches a été prélevé sur chaque fraction, évaporé à sec sous vide à 35°C et repris par de l'eau distillée. Dans chaque cas, des concentrations équivalentes à 10 g, 100 g et 500 g d'endive par litre de milieu final ont été incorporées aux milieux de culture .

Les résultats obtenus avec le test moelle de tabac sont présentés dans la figure 23. On voit que l'extrait acide à l'acétate d'éthyle aussi bien que l'extrait alcalin au butanol secondaire ont une activité de cytokinine, alors que la fraction aqueuse en est pratiquement dépourvue .

3. Purification de l'extrait alcalin. - L'extrait alcalin au butanol secondaire, concentré et chromatographié sur plaques de cellulose dans l'isopropanol à 80 % en atmosphère ammoniacale, a été séparé en plusieurs zones :

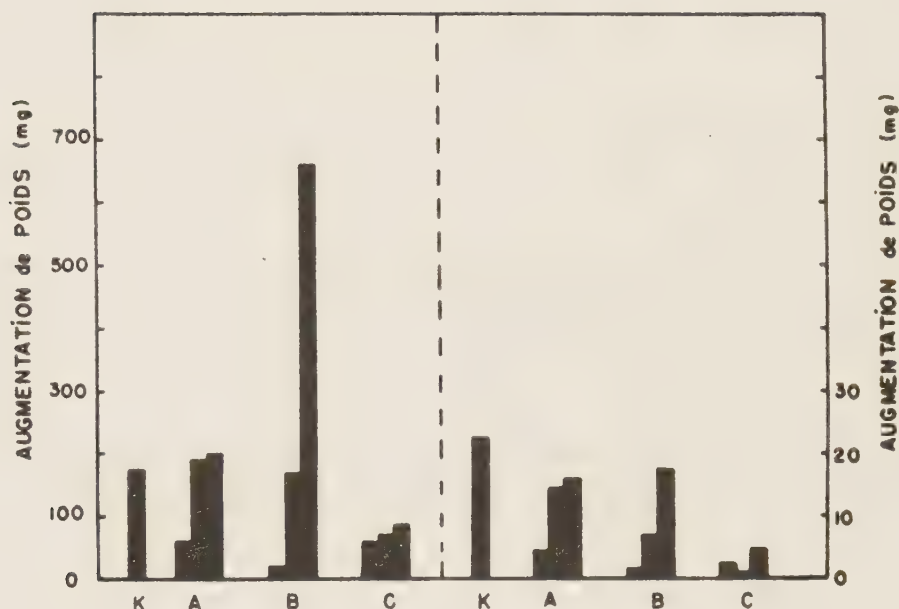


Fig. 23 - Activité biologique des fractions de l'extrait S_1 obtenues après partage avec l'eau et l'acétate d'éthyle ou le butanol secondaire .

K = témoin avec kinétine (5×10^{-7} M) .

A = extrait à l'acétate d'éthyle.

B = " au butanol secondaire .

C = phase aqueuse résiduelle .

Pour chaque extrait, on a employé 3 concentrations, correspondant respectivement à 10, 100 et 500 g de racines fraîches par litre de milieu .

En ordonnées : augmentations moyennes de poids des cals frais (à gauche) et secs (à droite) de moelle de tabac .

	<u>Rf</u>
Zone frontale	0,98 - 1,00
1ère bande bleue	0,88 - 0,98
Bande fluorescente	0,79 - 0,88
2ème bande bleue	0,59 - 0,79
Interzones	0,04 - 0,59
Spot de départ	0,00 - 0,04

Le test moelle de tabac a révélé que l'activité biologique se trouvait surtout à la bande de Rf 0,88 - 0,98 .

Une purification plus avancée de cette bande active ne pouvait être réalisée, car l'activité totale de cet extrait ne représente que la 16ème partie de celle de l'extrait acide .

4. Purification de l'extrait acide . - La fraction obtenue par l'extraction à l'acétate d'éthyle a été purifiée plus avant par chromatographie sur plaques de cellulose .

Pour éliminer diverses impuretés contenues dans la cellulose, nous avons procédé comme suit .

La cellulose Whatman CC₄₁ a été mise en suspension dans de l'eau distillée à raison de 100 g de poudre pour 220 ml d'H₂O. Après agitation mécanique pendant 15 min., le mélange a été étalé sur des plaques de verre, sur 1 mm d'épaisseur. Après séchage pendant 15 h. environ, les plaques ont été lavées 2 fois au méthanol distillé et 1 fois au chloroforme (R. P.) de façon à enlever une impureté liposoluble. Pour obtenir une bonne chromatographie, nous n'avons pas mis plus de 20 à 30 µl d'extrait par plaque de 20 cm de large .

Trois solvants ont été essayés ; l'eau distillée (100 %), le butanol secondaire (85 %) et l'isopropanol (80 %) en atmosphère ammoniacale. C'est ce dernier solvant qui a donné les bandes les plus nettement délimitées et que nous avons donc employé. La chromatographie a été réalisée de la manière suivante : le mélange isopropanol (80) + eau (20) a été versé au fond de la cuve à chromatographie tandis qu'on déposait environ 3 ml de NH₄OH concentré sur deux rectangles de papier filtre

tapissant les 2 grandes parois de la cuve .

300 plaques de 20 x 20 cm ont été utilisées pour purifier la totalité de l'extrait acide. Examinées en lumière ultraviolette (254 nm) , les plaques ont montré un certain nombre de bandes qui ont été grattées à la spatule. Un échantillon de la poudre des zones ainsi délimitées a été éprouvé au test moelle de tabac. Ainsi que le montre la figure 24, trois zones se sont montrées actives : une zone située en-dessous d'une bande absorbant fortement la lumière à 254 nm, une zone gris-noir et une zone fluorescente .

Cette dernière zone a été rechromatographiée dans le même solvant qui a alors séparé deux bandes : une bande fluorescente à 254 nm (Rf 0,68-0,84) et une bande absorbant la lumière ultraviolette de cette même longueur d'onde (Rf 0,84-0,96). Ces deux bandes se sont montrées actives sur le test moelle de tabac (fig.25), mais elles ont produit des cals d'aspects différents. La bande fluorescente a donné des cals lâches, augmentant très rapidement en volume, alors que la bande absorbante a donné des cals serrés. 160 plaques de 20 x 20 cm ont été nécessaires pour effectuer cette purification .

5. Purification de la bande absorbante. - La zone absorbant la lumière ultraviolette a été grattée puis éluée au méthanol. L'extrait a été concentré sous vide partiel à 30°C jusqu'à 5 ml .

Nous avons alors rechromatographié cet extrait sur plaques de cellulose dans le mélange butanol secondaire (95) + H₂O (5). Ce solvant a encore séparé plusieurs bandes comme suit :

	Rf
Spot de départ	0,00 - 0,05
Bande	0,05 - 0,29
Bande fluorescente	0,29 - 0,65
Bande bleu clair	0,65 - 0,82
Bande absorbante violette	0,82 - 0,98
Zone frontale	0,98 - 1,00

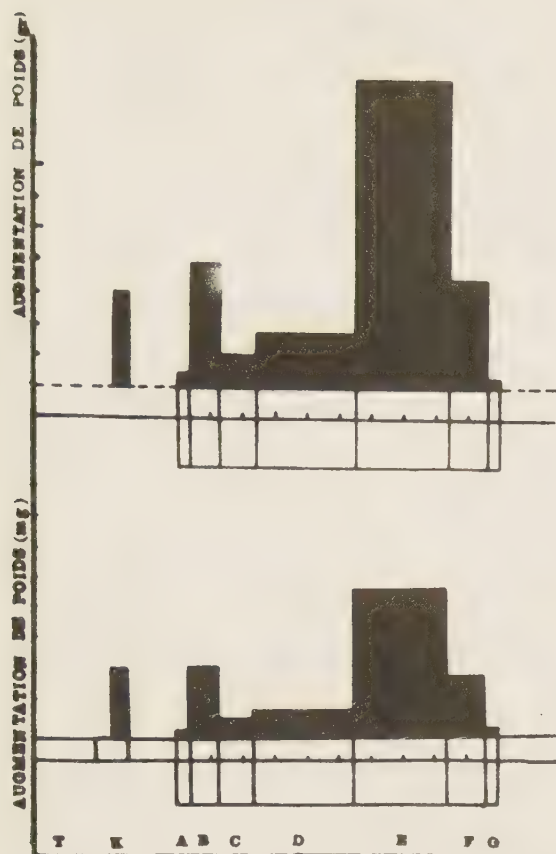


Fig. 24 - Activité biologique de l'extrait acide à l'acétate d'éthyle après chromatographie sur couches minces de cellulose dans l'isopropanol à 80 % .
 T = témoin sans cytokinine (trait pointillé horizontal). K = témoin avec kinétine ($5 \times 10^{-7}M$). Découpage du chromatogramme : A = spot de départ, B = bande incolore, C = bande absorbant dans l'UV, D = bande incolore, E = bande gris-noir, F = bande fluorescente, G = front . En ordonnées : poids des explantats frais (en haut) et secs (en bas) de moelle de tabac .

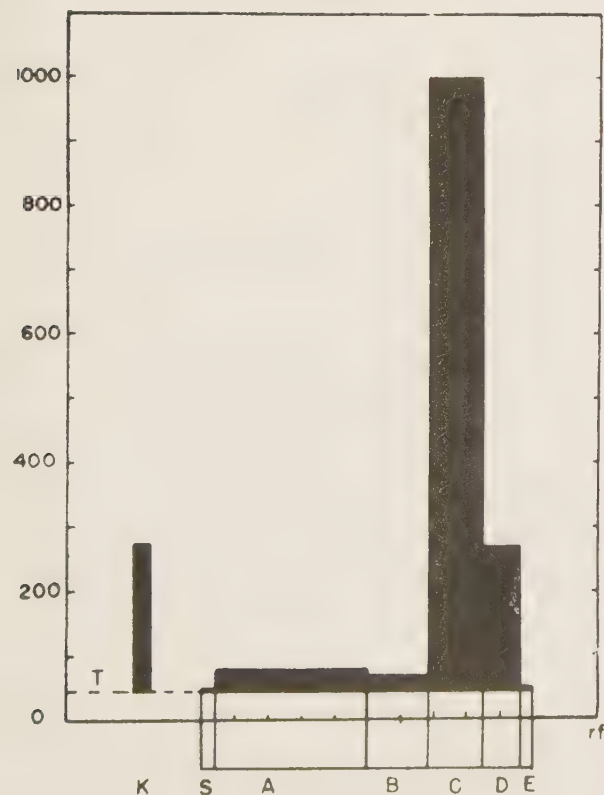


Fig. 25 - Activité biologique de la bande fluorescente F (fig. 24) après une nouvelle chromatographie sur couche mince de cellulose dans l'isopropanol à 80 % .
 T = témoin sans cytokinines (trait pointillé (horizontal), K = témoin avec kinétine ($5 \times 10^{-7}M$). Découpage du chromatogramme : S = spot de départ, A = bande incolore, B = bande bleu clair, C = bande fluorescente, D = bande absorbante violette, E = front du solvant. En ordonnées : poids des cals de moelle de tabac .

6. Obtention d'une cytokinine cristallisée. - La bande absorbante violette de Rf 0,82 - 0,98 a été éluée au méthanol très pur et **rechromatographiée** à nouveau sur plaques de cellulose dans le butanol secondaire à 95 % . La bande active au test moelle de tabac a été encore éluée au méthanol . Après évaporation du solvant sous vide partiel à 30°C, nous avons obtenu un produit blanc-crème pesant environ 2 mg. Au cours d'une recristallisation dans du méthanol, de petits cristaux, biologiquement actifs, se sont formés sur la paroi du récipient .

IV. IDENTIFICATION CHIMIQUE DE LA CYTOKININE CRISTALLISÉE .

Une série de tests physiques et chimiques ont été effectués sur les cristaux actifs obtenus. Ils ont permis d'identifier la cytokinine extraite des racines d'endives .

A. Position chromatographique .

Une chromatographie sur pellicule de cellulose MN Cel 300 dans l'eau pure avec diverses cytokinines connues a donné le résultat suivant :

	<u>Rf</u>
Riboside de la zéatine	: 0,68
Cristaux (racine d'endive)	: 0,68

Il y a concordance exacte entre la substance inconnue et le riboside de la zéatine .

B - Présence de ribose .

Pour nous assurer que la substance cristallisée contenait bien du ribose, nous avons employé la technique de Buchanan (1950) qui met à profit l'oxydation produite par le tétra-acétate de plomb sur la fonction -glycolique des ribosides .

Le chromatogramme, préalablement séché, a été imprégné de xylène, puis d'une solution benzénique de tétra-acétate de Pb à 1 g pour 100 ml. Sur le fond brun produit par le PbO_2 à partir du tétra-acétate non utilisé, est apparu la tache blanche des ribosides combinés au plomb. Un essai biologique a montré que la zone blanche était active sur la moelle de tabac. La substance cristallisée est donc bien un riboside.

C - Spectres d'absorption dans l'ultraviolet.

Si l'aglycone du composé cristallisé est une purine, il doit avoir un spectre caractéristique dans l'ultraviolet. De fait, une solution méthanolique des cristaux actifs a donné un tel spectre, avec un maximum à 267 nm et un minimum à 237 nm (fig. 26). La position du maximum varie légèrement selon que le milieu est acide ou alcalin : 264 nm dans HCl 1 N, 268 nm dans NaOH 1 N. Nous en concluons qu'il s'agit bien d'une purine. D'ailleurs un échantillon de riboside de zéatine passé en même temps au spectrophotomètre Beckmann II A a donné des spectres analogues (fig. 26).

D - Chromatographie en phase gazeuse.

Most et coll. (1968) ont montré qu'il est possible de séparer et d'identifier les cytokinines par chromatographie en phase gazeuse sur des colonnes de Diataport S (terre d'infusoires silanisée) imprégnée de 3 % de "SE 52".

Le Dr. B. H. Most a bien voulu chromatographier pour nous un échantillon des cristaux actifs après en avoir préparé le dérivé triméthylsilique. Les résultats ont été concluants. D'une part, les cristaux ont produit un pic ayant exactement le même temps de rétention qu'un échantillon de riboside de zéatine (fig. 27). D'autre part, un mélange des cristaux provenant de l'endive et de riboside de zéatine chromatographiés ensemble n'a donné qu'un seul pic, bien symétrique (fig. 28). Ces résultats permettent d'identifier le produit cristallisé au riboside de la zéatine.

E - Spectre de masse.

Grâce à l'obligeance du Dr. Das de l'Institut de Chimie des

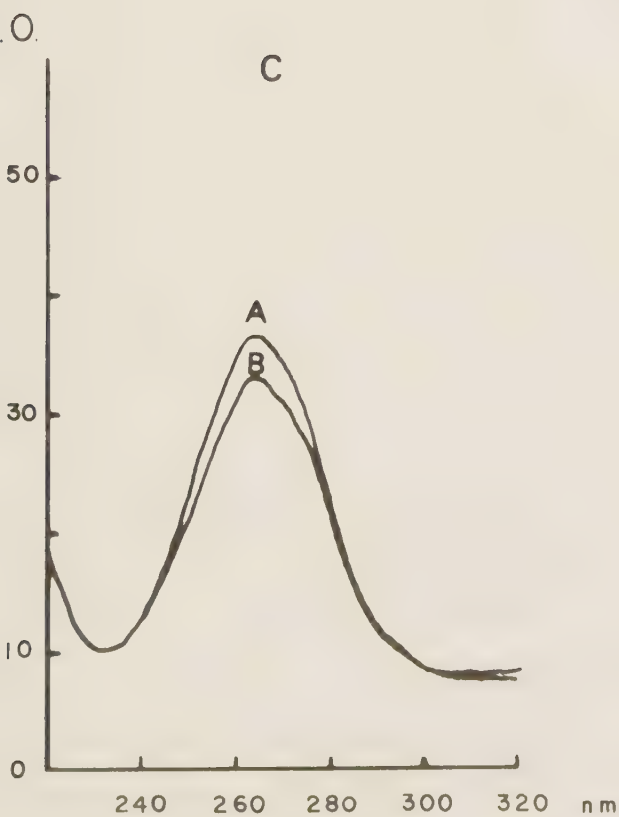
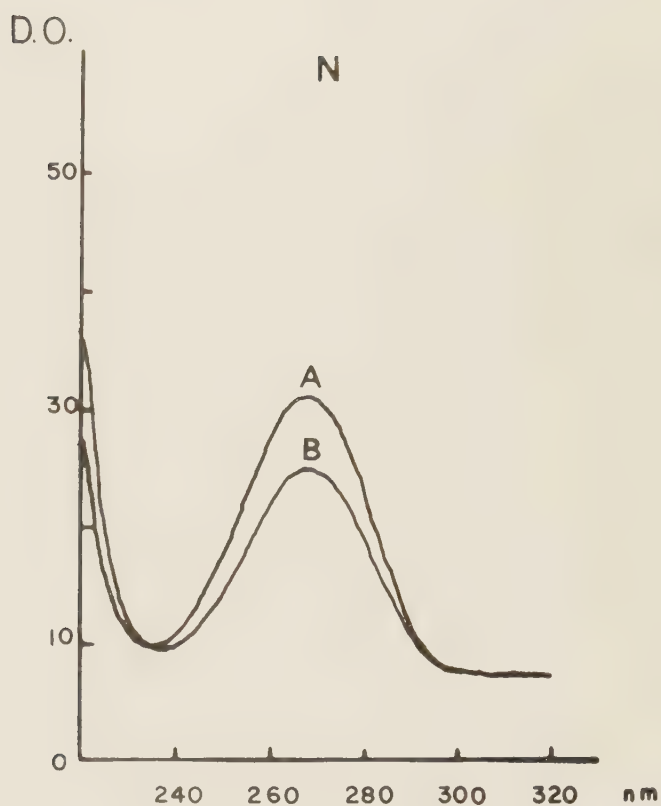
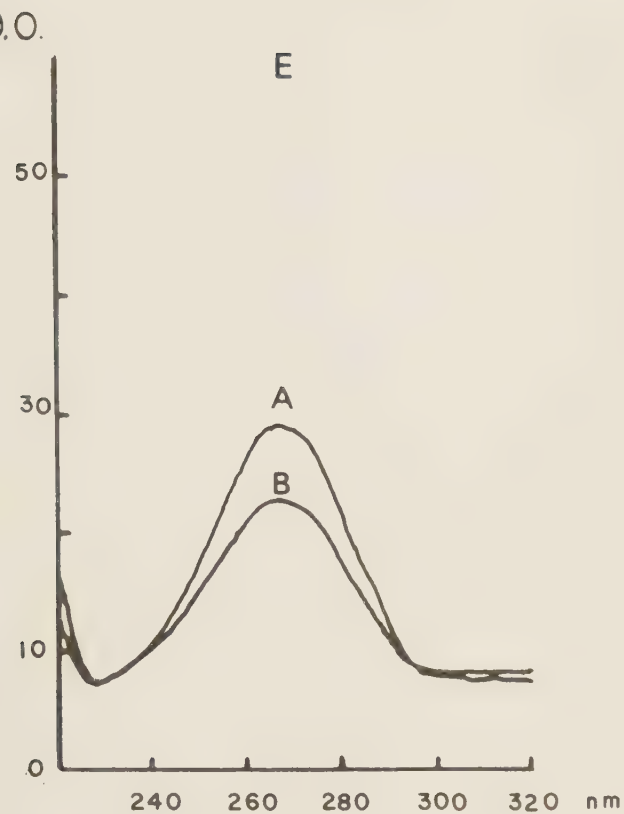


Fig. 26 - Spectres d'absorption dans l'ultraviolet de la cytokinine isolée des racines d'endive.

A = substance cristallisée .

B = riboside de zéatine .

Spectres effectués en milieu méthanolique (E), alcalin (N) ou acide (C) .

En abscisses : longueurs d'onde en nanomètres .

En ordonnées : densités optiques .

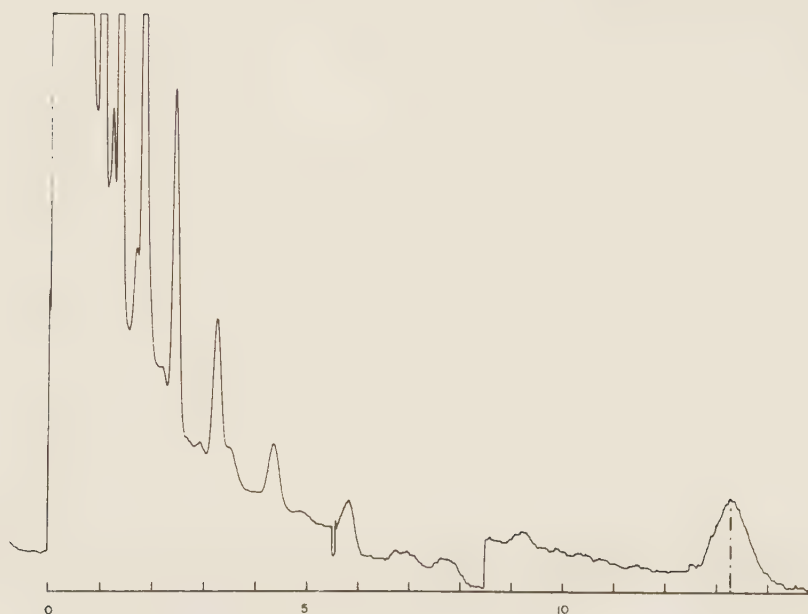
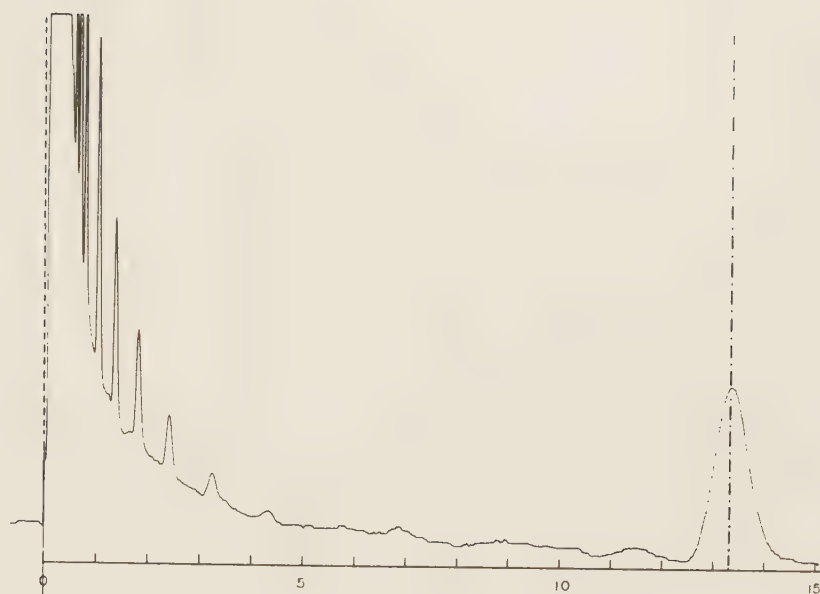


Fig. 27 - Chromatographie en phase gazeuse de la cytokinine cristallisée de l'endive (en haut) et du riboside de la zéatine (en bas) après transformation en dérivés triméthylsiliques .

Colonne de Diataport S contenant 3 % de "SE-52".
Température : 250°C. Dans le graphique du bas, on a effectué un changement de sensibilité de l'appareil entre les unités 5 et 6 de temps de rétention .

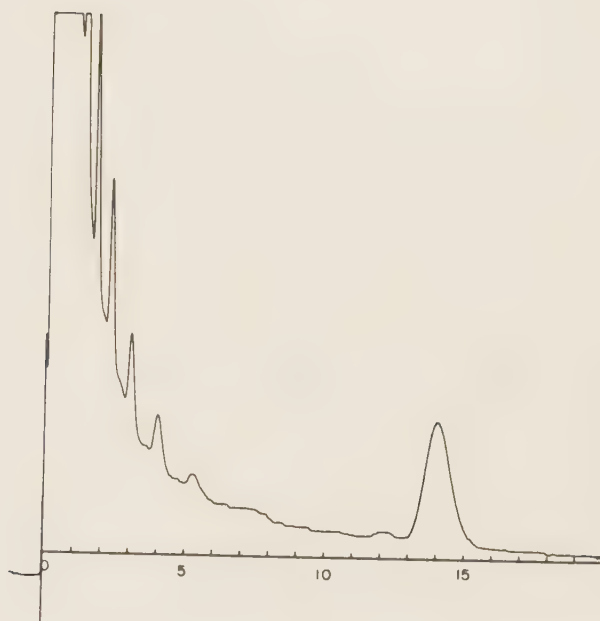


Fig. 28 - Co-chromatographie en phase gazeuse des dérivés triméthylsiliqués de la cytokinine de l'endive et du riboside de la zéatine sur colonne Diataport S contenant 2 % de "SE-33" à 250°C.

En abscisses : unités de temps de rétention .

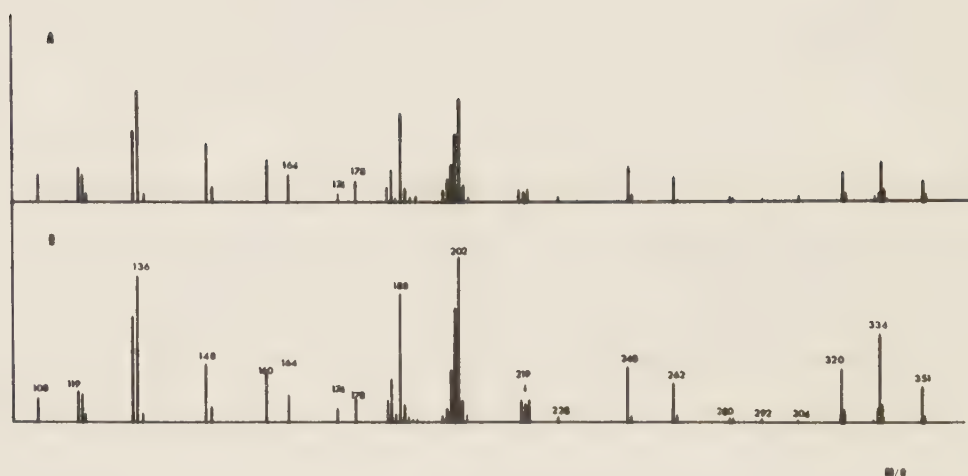


Fig. 29 - Spectres de masse des cristaux provenant de l'endive (A, en haut) et du riboside de la zéatine (B, en bas).

En abscisses : M/e .

En ordonnées : intensités relatives .

Substances Naturelles du C.N.R.S., nous avons pu obtenir un spectre de masse avec le produit cristallisé, d'une part, et avec du riboside de la zéatine d'autre part. Le spectre de masse du produit provenant de l'endive a donné comme poids moléculaire : 351 .

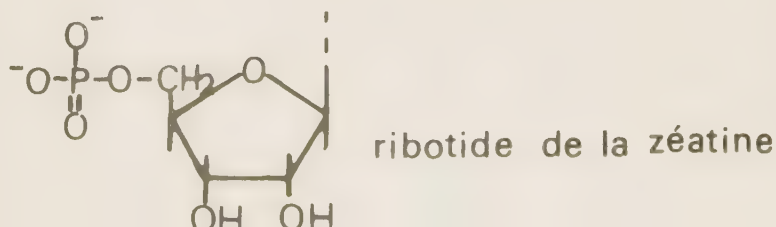
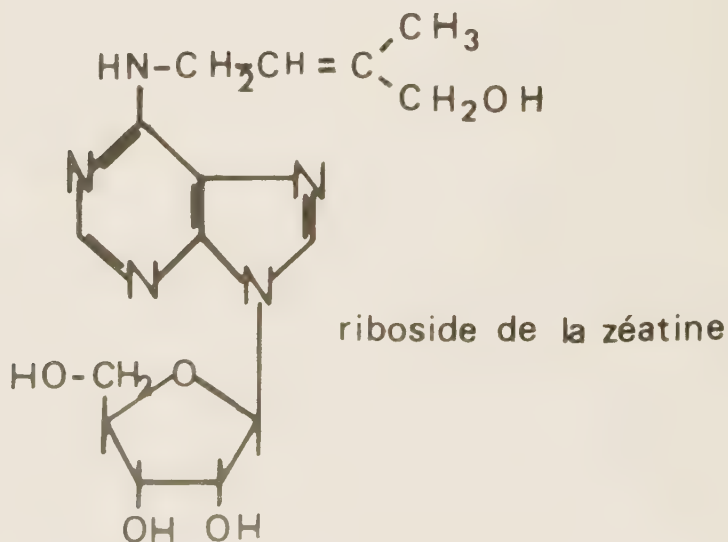
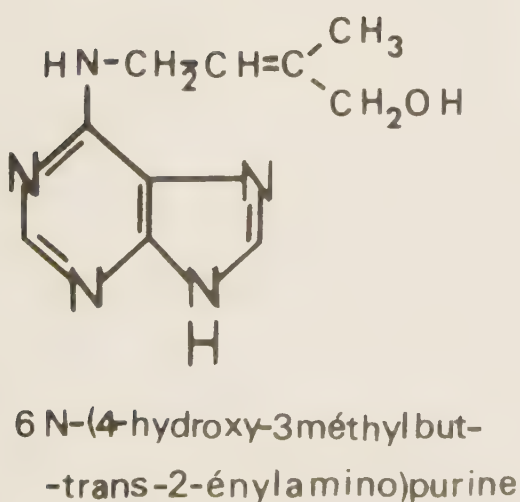
Parmi les pics du spectre on en observe un particulièrement à $m/e = 135$, qui, selon Helgeson (1968), est caractéristique de l'ion adénine ($C_5H_5N_5^+$). D'ailleurs le spectre du composé cristallisé est en tout absolument identique à celui du riboside de la zéatine (fig. 29) .

F - Conclusions .

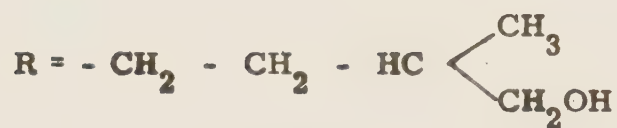
En conclusion on peut dire que la cytokinine qui a pu être isolée et cristallisée des racines d'endive est le riboside de la zéatine. Les données chromatographiques sur pellicule ou en phase gazeuse, la présence de ribose, les spectres caractéristiques dans l'ultraviolet, et, finalement, le spectre de masse, tout concourt à cette identification sans équivoque .

G - Structure chimique de la zéatine et de ses dérivés .

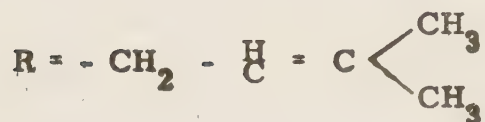
La structure chimique de la zéatine a été déterminée par Letham et coll. (1964) .



Chez les autres cytokinines, c'est la chaîne latérale en position 6 qui est différente, par exemple :



dihydrozéatine



γ-γ-diméthyl-allyl-aminopurine ou isopentényladénine.

IIIème PARTIE

Au terme de ce travail il y a lieu de poser quelques questions sur la portée physiologique du résultat obtenu. A ces questions il est difficile d'apporter des réponses satisfaisantes car l'état des connaissances dans ce domaine est encore embryonnaire. Différents points principaux seront abordés : l'ubiquité de la zéatine chez les végétaux supérieurs, le lieu de synthèse des cytokinines naturelles, leur transport et métabolisme dans la plante, l'origine des cytokinines de la racine d'endive, et le rôle possible des cytokinines dans les phénomènes de bourgeonnement de la racine d'endive .

1) Ubiquité de la zéatine chez les végétaux supérieurs :

Nos résultats apportent, pour la première fois semble-t-il, l'exemple de l'isolement, à l'état pur et cristallisé, d'une cytokinine extraite de l'appareil végétatif d'une plante. Cette substance est le riboside de la zéatine. Il ne s'agit pas là d'un composé nouveau, mais d'une cytokinine qui a déjà été extraite de graines et fruits immatures. De fait, si l'on considère les résultats du Tableau I, on constate que, mis à part la 6N-méthyladénine qui n'a qu'une faible activité, toutes les cytokinines extraites jusqu'ici de plantes supérieures sont ou de la zéatine ou l'un de ses dérivés. De plus, dans la plupart des cas où une identification précise n'a pu être effectuée, mais où les travaux ont été suffisamment poussés, il semble qu'on ait affaire également à de la zéatine ou ses dérivés. La seule exception marquante est constituée par les résultats de Wood et collaborateurs selon lesquels la cytokinine active de certains tissus tumoraux ou anergisés serait un dérivé de la nicotinamide .

2) Lieux de synthèse des cytokinines naturelles .

Les tableaux I et II montrent que les cytokinines naturelles ont été isolées ou mises en évidence à partir de toutes les parties de la plante, ce qui pose le problème du lieu de synthèse de ces substances .

Pour isoler la cytokinine de l'endive, nous sommes partis de tissus qui comprenaient à la fois le collet et la racine sous-jacente. A cause de cette hétérogénéité du matériel nous ne pouvons savoir exactement dans quel tissu se trouvait le riboside de la zéatine que nous avons isolé. Cependant les divers tissus de l'endive sont probablement tous riches en cytokinines, puisque chacun, cultivé séparément, produit directement des bourgeons, sauf pour le parenchyme vasculaire qui n'en forme qu'après avoir donné naissance à du liber (Gautheret, 1942a). Les feuilles (Toponi, 1963a; Nitsch et Nitsch, 1964) et même les hampes florales (Harada, 1966 ; Margara, 1965 ; Nitsch, 1967) sont également capables de produire des bourgeons in vitro .

Mais la présence de la cytokinine dans ces divers tissus prouve-t-elle sa formation à ces endroits ? Et le riboside de la zéatine isolé au cours de ce travail ne pourrait-il pas être synthétisé en quelque endroit de la partie aérienne pour n'être ensuite que mis en réserve dans la racine ?

Bien avant la découverte de la kinétine, Chibnall (en 1939) parlait déjà d'une hormone de racine qui, montée jusqu'aux feuilles, maintiendrait leur métabolisme en inhibant la chute du taux de protéines qui suit leur détachement, métabolisme qui se rétablit lorsque des racines adventives se forment sur la feuille détachée. Went et Bonner (1943) ont observé une forte réduction de croissance de la tige de tomate quand les racines sont enlevées, inhibition qui pouvait être levée par l'albumen de coco. Parthier (1964) montra que la capacité de synthèse des protéines dans les feuilles détachées augmentait aussitôt qu'apparaît la 1ère racine sur le pétiole .

Or Richmond et Lang (1957) ont démontré que l'application de la kinétine retarde la perte de protéines et chlorophylles des feuilles détachées de Xanthium, tandis que Skoog et Miller (1957) observaient que la kinétine induit en culture in vitro l'élongation de bourgeons dépourvus de racines .

De plus, Loeffler et Van Overbeek (1963), puis Nitsch et Nitsch (1965) chez la vigne, Kende (1964, 1965) chez l'Helianthus annuus ont montré que la sève brute possède une activité de cytokinine, ce qui confirme les travaux de Kulaeva (1962) .

La similitude des phénomènes naturels évoqués avec les résultats produits par une application de kinétine suggèrent qu'une des substances hypothétiques provenant des racines pourrait être une cytokinine. La sève brute provenant des racines de plantes herbacées — comme Impatiens glandulifera, Xanthium pennsylvanicum, Pisum arvense et Lupinus angustifolius (Carr et Burrows, 1966 — contiendrait des cytokinines identiques à celle provenant d'arbres comme le bouleau et le sycomore (Reid et Burrows, 1968). En effet, après traitement par le butanol normal, elles contiennent toutes 2 cytokinines dans la phase butanolique (Rf 0,3-0,5 et Rf 0,8-0,9) et une autre dans la phase aqueuse (Rf 0,2-0,4) (Carr et Reid, 1967). L'identité de ces composés n'est pas connue, mais ceux de la phase butanolique ont les mêmes comportements chromatographiques que la zéatine et son riboside, et celui de la phase aqueuse que le ribotide correspondant.

L'isolement du riboside de la zéatine à partir des racines d'endive, la présence de cytokinines dans les racines de haricots (Seth et Wareing, 1965) et dans la sève brute conduisent à penser que les racines pourraient être l'un au moins des sites de la biosynthèse des cytokinines. Une telle hypothèse pourrait être vérifiée en fournissant à la racine des précurseurs marqués.

3) Transport et métabolisme des cytokinines.

Stockée ou synthétisée dans la racine, pourquoi et comment la cytokinine monte-t-elle dans la partie supérieure ?

De nombreuses études ont été faites sur le transport de la kinétine et de la 6-benzylaminopurine : Chvojka et coll (1961) injectaient la benzyladénine radioactive dans les pétioles de feuilles de pommier et détectaient la radioactivité dans la tige à 10 cm au-dessous du point d'application, le mouvement acropète était négligeable.

Osborne et Black (1964) ont mis en évidence un transport polarisé basipète de la benzyladénine avec des fragments de pétioles de Phaseolus vulgaris. Par contre, Fox et coll. (1965) ont obtenu un mouvement dans toutes les directions de la même substance chez différents matériels végétaux (pétioles de Phaseolus, coléoptile d'avoine, épicotyle de pois et pétiole de

Coleus. Mais Lagerstedt et Langston (1966) ont montré que le transport de la kinétine 8^{-14}C peut être non polarisé dans des fragments de pétioles de Xanthium et de jeunes pétioles de Phaseolus, et polarisée dans des pétioles de feuilles âgées .

Dans le cas de fragments de tiges de pois, Kaminek (1965) observe que la kinétine marque ses effets dans le sens racine-feuilles (en stimulant la croissance des bourgeons axillaires situés au-dessus du point d'application) .

Dans les expériences de Seth et coll. (1966) avec des plantules décapitées de pois, la kinétine migre dans le sens basipète et l'AIA augmente la migration de ce composé .

De ces résultats souvent contradictoires, on peut conclure que la kinétine et la benzylaminopurine se déplacent dans la plante et que le déplacement ne se fait pas à sens unique. Cette circulation nécessite un appel physiologique en quelque point de la plante quand il y a un sens plus favorisé que l'autre. Cet appel peut se traduire par un gradient de concentration le long du parcours : le déplacement paraît alors correspondre à un transport passif, observé avec des sections d'épicotyle de Lens (Pilet et coll. , 1967). Mais il existe aussi des mécanismes régulateurs inconnus qui favorisent le transport vers des régions de croissance comme les fruits, graines, cambium et bourgeons. Ainsi, la 6-benzylaminopurine injectée dans une jeune plante étiolée de pois chiche, est transportée dans l'épicotyle jusqu'au bourgeon terminal, ce transport est polarisé dans le sens acropète (Guern et coll. 1966). Le sens du transport, acropète ou basipète, dépend des positions relatives du point d'application de la cytokinine et des rameaux en croissance (Guern et coll. , 1967). La position relative du point d'application des cytokinines par rapport aux régions de croissance active, peut expliquer les résultats contradictoires publiés quant au sens du transport des cytokinines dans la plante. Mais les bases libres, peu solubles, peuvent elles se déplacer sous cette forme de cellule à cellule ? On sait que l'administration de cytokinines artificielles sous forme de bases libres, comme la benzyladénine, engendre la formation du riboside et du ribotide correspondant dans les feuilles de Xanthium (Mc Calla et coll. , 1962). La

même substance, injectée dans l'épicotyle de jeunes pois, est transformée en riboside que l'on retrouve dans le bourgeon terminal (Guern, 1966). Cette transformation en dérivés plus solubles est-elle seulement nécessaire pour la mobilité du composé à travers la plante, ou bien est-elle aussi indispensable à son activité biologique ? La présence du riboside de la zéatine dans la racine pourrait indiquer que cette forme, plus soluble que la base correspondante, est nécessaire pour son déplacement vers la partie supérieure .

4) Origine des cytokinines de la racine d'endive .

Le riboside de la zéatine de la racine d'endive a été isolé sous forme libre. Or, l'isomère *cis*- de ce composé a été extrait de l'ARN soluble de graines immatures de maïs et de pois, ainsi que de feuilles d'épinard (Hall et coll. 1966). De même une cytokinine très voisine, l'isopentenyladénosine, se trouve dans les ARN de transfert de levure, de tissus de mammifères, ainsi que de graines immatures de pois et de feuilles d'épinard. On peut donc se demander si le riboside que nous avons isolé provenait aussi d'ARN de transfert ou s'il faisait partie de quelque autre système régulateur inconnu ? Les résultats que nous avons présentés ne permettent pas de trancher entre ces 2 possibilités. Mais isolée sous forme de riboside, cette cytokinine pourrait avoir pour origine les ARN. En effet, il semble que la chaîne latérale isopentényle des cytokinines soit attachée sur le noyau adénine dans l'ARN de transfert déjà formé (Hall, 1977 ; Hall et coll. 1969). Dans le cas de l'isopentenyladénosine, le système enzymatique qui fixe la chaîne isopentényle à l'adénine délimitant l'anticodon de l'ARN a été mis en évidence dans les cellules de levure et de foie de rat (Fittler et coll. 1968) ainsi que de tissus de tabac (Hall et coll. 1969) .

Il resterait encore à expliquer pourquoi la zéatine isolée des tissus végétaux est la forme trans, alors que la zéatine présente dans les t-ARN est la forme *cis*. Ajoutons que les cultures de Rhizopogon roseolus sont capables d'hydroxyler l'IPA en trans-zéatine (Miura et Miller, 1969). Si cette transformation est possible chez les plantes supérieures, elle expliquerait peut-être l'abondance de cytokinines dans

les albumens des graines immatures, car ces tissus sont peu à peu digérés par l'embryon. L'hydrolyse des acides nucléiques de transfert pourrait libérer l'IPA qui serait alors transformé en zéatine. S'il en est ainsi, on devrait pouvoir mettre en évidence l'enzyme correspondante dans l'albumen, par exemple l'albumen liquide de la noix de coco .

5) Rôle des cytokinines de la racine d'endive .

L'isopentényladénosine, présente dans les ARN de transfert de la sérine et de la tyrosine chez la levure, se trouve placée à côté de l'anticodon (Zachau et coll. 1966 ; Madison et coll. 1966). Si l'on modifie la structure de ce composé dans l'ARN de transfert de la sérine, en traitant par l'iode, ce système accepte encore la sérine mais ne se lie plus efficacement avec le complexe-ribosome-ARN messager. (Fittler et Hall, 1966).

Ainsi, l'isopentényladénosine, faisant partie de l'ARN de transfert, joue un rôle important dans la synthèse des protéines .

Si on se réfère aux recherches de Hall, les cytokinines libres seraient des produits de dégradation des ARN. Or, les expériences ont montré que les tissus jeunes et actifs métaboliquement sont riches en cytokinines libres tandis que les tissus différenciés, comme la moelle de tabac, ont besoin de cytokinines exogènes pour proliférer. On peut penser que dans tous les tissus, il existe un système enzymatique qui dégrade les ribosides de l'IPA et de la zéatine à l'état libre (Hall, 1967) et qu'une inhibition de ce système enzymatique entraîne une augmentation du niveau de ces nucléosides libres dans les tissus. Ces considérations, cependant, n'expliquent pas pourquoi les racines seraient des sites privilégiés de synthèse de cytokinines. On pourrait plutôt rapprocher cette propriété de celle qu'ont les racines de synthétiser les alcaloïdes .

6) Rôle possible des cytokinines dans les phénomènes de régénération de bourgeons .

Tous les chercheurs qui ont travaillé avec la racine d'endive ont observé le très haut pouvoir de régénération des tissus de cet organe. L'isolement du riboside de la zéatine peut-il être lié à cette grande propension à produire des bourgeons ?

Avant que soient connues les cytokinines, les physiologistes ont surtout vu les phénomènes de bourgeonnement à travers des modifications dans le niveau des auxines. En effet Gautheret (1942) avait montré que des niveaux relativement élevés d'auxine empêchaient tout bourgeonnement. Camus (1949) a mis en évidence une baisse d'auxine dans les tissus d'endive cultivés in vitro précédant l'apparition de bourgeons. Warmke et Warmke (1950) ont confirmé ce résultat avec des boutures de racines d'endive. Vardjan et Nitsch (1961) ont précisé, en employant des méthodes chromatographiques, que la racine d'endive contenait au moins deux substances à caractère auxinique, dont les niveaux baissaient davantage dans la zone apicale des boutures de racine que dans la partie basale avant l'apparition des bourgeons. Ainsi le bourgeonnement semble être sous la dépendance du niveau des auxines dans les tissus.

Les gibbérellines inhibent aussi le bourgeonnement, peut être de façon encore plus radicale que les auxines. Les expériences de Murashige (1964) sur le tabac, de Reinert et Besemer (1947) et Bigot et Nitsch (1968) sur le *Begonia rex* ont montré nettement que les gibbérellines bloquent tout bourgeonnement. Chez l'endive cette action de la gibbérelline ne se manifeste, d'après Reinert et Besemer que lorsqu'on ajoute simultanément au milieu de la kinétine.

Il semble que la formation des bourgeons de la racine d'endive puisse être liée à l'existence de la zéatine dans ces tissus. En effet Vardjan et Nitsch (1961) ont fait l'analyse des variations des cytokinines endogènes dans les zones apicales et basales (épaisses de 1 cm) de boutures de racines d'endive de 10 cm de long. Ils ont trouvé que la zone apicale contenait toujours plus de substances à activité de cytokinine que la zone basale. D'autre part, tandis que le niveau de ces substances dans la zone basale baisse légèrement au cours de la régénération, celui de la zone apicale monte brusquement au 3^e jour comme s'il y avait mobilisation de ces substances vers des régions supérieures dans lesquelles elles s'accumuleraient.

Ces résultats peuvent être rapprochés des travaux de Lindner (1940) qui a réalisé des expériences très claires avec des explantats cylindriques de 6 mm de diamètre prélevés dans les racines de raifort

(Cochlearia armoricana) autour des points d'insertion des radicelles. Il notait d'abord que le nombre de racines formées sur ces explantats ne variait pas avec la longueur des cylindres de tissus. Par contre, plus ces explantats étaient long, plus ils produisaient de bourgeons comme si le nombre de bourgeons formés était fonction de la réserve de tissus que comportait l'explantat. Dans une seconde expérience, Lindner mettait à régénérer des explantats cylindriques ayant tous initialement la même longueur (8 mm) ; mais au bout de 1, 2, 3 ... 10 jours, après le prélèvement des explantats, il en supprimait 6 mm, ne gardant que les 2 mm de l'extrémité corticale. Lorsque cette ablation était réalisée pendant les premiers jours de la régénération, le nombre de bourgeons formés sur les 2 mm restant était faible, si elle était faite après 5 jours, le nombre de bourgeons était 5 fois plus élevé. Ces résultats sont compatibles avec l'existence de substances semblables à celles dosées dans la racine d'endive, qui seraient réparties initialement à travers toute la masse des tissus, puis mobilisées vers les points où se formeront les bourgeons. Des résultats allant dans le même sens ont été obtenus par Emery (1955) avec des boutures de racine de Chamaenerion angustifolium.

Si l'on admettait l'existence d'une substance qui est mobilisée vers les régions apicales au cours du bouturage, peut-on penser que c'était une cytokinine ?

Les expériences de Skoog et de Miller (1957) avec des cultures de tabac montrent très nettement combien les cytokinines stimulent le bourgeonnement, phénomène qui se retrouve chez de nombreuses autres espèces. Par exemple, chez le Begonia rex, la néoformation de bourgeons sur des explantats foliaires est fortement augmentée par la 6-furfuryl-aminopurine et la 6-benzyladénine (Bigot, 1966). Chez le Plumbago indica C. Nitsch et J. P. Nitsch (1967) ont montré que la zéatine était la plus active des cytokinines essayées. Cette action est amplifiée fortement par l'adénine. De même Paulet et Nitsch (1959) en étudiant la néoformation de bourgeons de disques de folioles de Cardamine pratensis, ont montré que certains composés entrant dans le métabolisme des acides nucléiques (adénine, guanine, cytosine, uracile, thymine, glycine, asparigine, ions NH_4^+) stimulent tous la formation de bourgeons.

Mais tous ces faits n'expliquent pas comment les cytokinines stimulent le bourgeonnement .

CONCLUSION. - Si la voie de biosynthèse des cytokinines présentes dans certains ARN de transfert semble, à l'heure actuelle, relativement claire, de même que leur importance à côté de l'anticodon, il n'en reste pas moins que le mode d'action des cytokinines dans divers systèmes physiologiques reste une question importante qui n'a pas encore trouvé de réponse satisfaisante .

RESUME

Les recherches entreprises sur les cytokinines naturelles dans le cadre du présent travail ont permis : (1) d'étudier diverses méthodes de mise en évidence, extraction et purification de ces substances, (2) d'isoler une cytokinine naturelle à partir de racines, (3) de préciser quelque peu la propension naturelle de la racine d'endive à former des bourgeons .

I - RECHERCHES SUR LES METHODES DE DETECTION, D'EXTRACTION ET DE PURIFICATION DES CYTOKININES NATURELLES .

Méthodes de détection. - Pour doser les cytokinines naturelles, on a utilisé deux des principales propriétés physiologiques des cytokinines : leur pouvoir de retarder la dégradation de la chlorophylle chez les feuilles détachées et celui de provoquer la division cellulaire .

Aucun des tests biologiques essayés n'a donné de résultats quantitatifs très précis. A défaut de mieux, nous avons opté pour le test moelle de tabac qui est basé sur la division des cellules et s'effectue en conditions aseptiques .

Méthodes d'extraction. - Nous avons étudié le cas de matériel végétal sec (lyophilisé) et celui de matériel frais. Dans le premier cas, l'eau bouillante (après une éventuelle pré-extraction à l'éther) donne de bons résultats. Dans le second, une extraction au méthanol absolu (qui devient aqueux par suite de l'eau des tissus) évite l'emploi de la chaleur.

Méthodes de purification. - Diverses méthodes chimiques et physiques ont été essayées pour purifier les extraits bruts .

1. Méthodes chimiques. - Les deux méthodes chimiques qui ont été explorées sont basées, l'une sur le fait que la quasi-totalité des cytokinines naturelles sont des purines, l'autre sur celui que certaines d'entre elles se trouvent à l'état phosphorylé. Dans le premier cas, une précipitation aux ions Ag^+ en milieu acide (pH 2,8) est recommandable. Le méthanol présent dans la solution aqueuse ne gêne pas la précipitation. L'argent est éliminé ensuite par addition d'ions Cl^- . Dans le cas de cytokinines phosphorylées, on peut les retirer d'une solution aqueuse par précipitation avec des ions Ba^{++} , ces derniers étant ensuite éliminés par des ions SO_4^{--} .

2. Méthodes physiques. - Des fractions à activité de cytokinines provenant d'un extrait partiellement purifié de racines d'endive ont été retenues, puis éluées aussi bien avec une résine échangeuse de cations (Dowex 50) qu'avec une résine échangeuse d'anions (Dowex G_1). Rétention et élution ont aussi pu être obtenues avec une cellulose possédant les groupements basiques de la triéthanolamine (Whatman ET_{11}).

Le charbon actif est capable de retirer les cytokinines d'un extrait aqueux. Ces dernières peuvent être ensuite éluées par le méthanol bouillant, et, plus complètement, par la diéthylamine et le benzène.

Lorsqu'elles sont mises en présence d'eau et solvants organiques non miscibles, du type acétate d'éthyle, butanol ou même chloroforme, certaines cytokinines migrent vers la phase organique. Mais il n'est pas possible d'extraire ainsi toutes les cytokinines d'un extrait aqueux.

La chromatographie sur papier, et surtout sur couches minces ou pellicules de cellulose permet de séparer diverses cytokinines naturelles. Les résultats obtenus montrent que l'eau pure ou l'eau additionnée de 5 % de butanol secondaire fournit souvent les meilleures séparations.

Présence de cytokinines dans des tissus divers. - Au cours des recherches méthodologiques, la présence de cytokinines a pu être mise en évidence chez des matériaux divers, en particulier les graines

immatures d'okra et de pois, les tubercules de topinambour, les racines d'endive, la sève de vigne, les fruits immatures de concombre et les feuilles de tabac.

II - ISOLEMENT D'UNE CYTOKININE A PARTIR DE LA RACINE D'ENDIVE .

250 Kg de racines fraîches d'endive ont été traités au méthanol. L'activité de cytokinine de cet extrait n'est pas dû à un artéfact produit par la chaleur .

Après élimination de la fraction phosphorylée, la fraction non phosphorylée a été soumise à un partage entre acétate d'éthyle et eau à pH 3,0. La fraction acétate d'éthyle a été soumise à des chromatographies répétées sur couches minces de cellulose dans divers solvants. Un composé organique, dépourvu d'azote a d'abord été cristallisé et analysé : il s'est révélé inactif sur le test moelle de tabac. Un deuxième produit cristallisé s'est montré très actif. Son spectre d'absorption indiquait qu'il s'agissait d'une purine. Il a fourni une réaction positive à la présence de ribose. En chromatographie sur plaque de cellulose et, surtout, en chromatographie en phase gazeuse après sa transformation en dérivé triméthylsilique, il s'est révélé être identique au riboside de la zéatine. Cette conclusion a été confirmée par le spectre de masse. Ainsi a pu être identifiée la première cytokinine isolée d'un organe végétal qui ne soit pas une graine .

III - ROLE DE LA ZEATINE DANS LE BOURGEONNEMENT .

L'isolement du riboside de la zéatine à partir de tissus de racines montre que la zéatine n'est pas une cytokinine particulière aux graines. La zéatine est, en fait, l'une des cytokinines les plus actives sur le bourgeonnement .

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bamberger, E. et Mayer, A. M. 1960. Effect of kinetin on formation of red pigment in seedlings of Amaranthus retroflexus .
Science, 131 : 1094-1095 .
- Barzilai, E. et Mayer, A. M. 1964. Kinins in germinating lettuce seed.
Austral. Jour. Biol. Sci. 17 : 798-800 .
- Bauer, L. 1966a. Über ein Kinin aus Kalluszellen von Laubmoosen und seine Rolle der Morphogenese .
Ber. Deut. Bot. Ges. 79 : 207 .
- Bauer, L. 1966. Isolierung und Testung einer kinetinartigen Substanz aus Kalluszellen von Laubmoosporophyten .
Zeit. Pflanzenphysiol. 54 : 241-253 .
- Beauchesne, G. et Jouanneau, J. P. 1960. Progrès dans la technique de séparation et l'étude de la fraction neutre des substances de croissance de graines de maïs immatures .
C. R. Acad. Sci. Paris, 251 : 2396-2398 .
- Beauchesne, G. et Goutarel, R. 1964. Isolement d'une kinine à partir du maïs immature et détermination de sa formule chimique .
Régulateurs naturels de la croissance végétale, Colloq. Intern. CNRS, Paris, 123 : 119-122 .
- Bigot, C. 1966. Action de trois adéninessubstituées sur l'apparition de néoformations sur des explantats foliaires de Begonia.
Bull. Soc. Bot. Fr. 113, 9 : 433-439 .
- Bigot, C. 1968. Action d'adénines substituées sur la synthèse des bétacyanines dans la plantule d'Amaranthus caudatus L.
Possibilité d'un test biologique de dosage des cytokinines .
C. R. Acad. Sci. Paris, 266 : 349-352 .
- Bigot, C. et Nitsch, J. P. 1968. Effet du moment de l'application d'acide gibbérellique ou de 2,6-diaminopurine sur la néoformation des bourgeons ~~chez~~ Begonia rex .
C. R. Acad. Sci. Paris, 267 : 619-621 .

- Buchanan, J. G. , Dekker, A. A. et Long, A. G. 1950. The detection of glycosides and non-reducing carbohydrate derivatives in paper partition chromatography.
J. Chem. Soc. : 3162-3167 .
- Buvat, R. 1944-1945. Recherches sur la différenciation des cellules végétales.
Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Vég. , 5 : 1-130, et 6 : 1-119 .
- Camus, G. 1949. Recherches sur le rôle des bourgeons dans les phénomènes de morphogenèse .
Rev. Cytophytol. Biol. Vég. , 11 : 1-195 .
- Carr, D. J. et Reid, D. M. 1967. The physiological significance of the synthesis of hormones in roots and of their export to the shoot system.
Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances.
F. Wightman et G. Setterfield, Eds. , Runge Press, Ottawa : 1169-1185 .
- Carr, D. J. et Burrows, W. J. 1966. Evidence of the presence in xylem sap of substances with kinetin-like activity .
Life Sci. , 5 : 2061-2077 .
- Chibnall, A. C. 1939. Protein metabolism in the plant .
Yale University Press, New Haven .
- Chvojka, L. , Veres, K. et Kozel, J. 1961. The effect of kinins on the growth of apple-tree buds and on the incorporation of radioactive phosphate .
Biol. Plant. , 3 : 140-147 .
- Conrad, K. et Kohler, R. H. 1967. Zurspezifität eines Phytokinintests, der auf der Förderung der Betacyanbildung bei *Amaranthus* Keimlingen bezieht.
Wiss. Zeits. der Univ. Rostock : 657-659 .

- Emery, A.E.H. 1955. The formation of buds on the roots of Chamaenerion angustifolium .
Phytomorphology, 5 : 139-145 .
- Fittler, F. et Hall, R.H. 1966. Selective modification of yeast seryl-t-RNA and its effect on the acceptance and binding functions .
Biochem. Biophys. Res. Comm. 25 : 441-446 .
- Fittler, F., Kline, L., and Hall, R.H. 1968. N⁶-(Δ^2 -Isopentenyl) adenosine : Biosynthesis invitro by an enzyme extract from yeast and rat liver .
Biochem. Biophys. Res. Comm., 31 : 571-576 .
- Fox, J.E. 1966. Incorporation of a kinin, N⁶-Benzyladénine, into soluble RNA .
Plant Physiol., 41 : 75-82 .
- Fox, J.E., Weis, J.S., Osborne, D.J. et McCready, C.C. 1965. Transport of the kinin, N⁶-benzyladenine : non polar or polar ?
Nature, 206 : 678-680 .
- Gautheret, R.J. 1941. Recherches expérimentales sur la polarité des tissus de la racine d'endive .
C. R. Acad. Sci., Paris, 213 : 37-39 .
- Gautheret, R.J. 1942. Le bourgeonnement des tissus végétaux en culture .
Science, 40 : 95-128 .
- Gautheret, R.J. 1942a. Remarques sur le développement de fragments de tissus d'endive cultivés in vitro .
C. R. Soc. Biol., 136 : 341-342 .
- Gorton, B.S., Skinner, C.G. et Eakin, R.E. 1957. Activity of some 6-(substituted)purines on the development of the moss Tortella caespitosa .
Arch. Biochem. Biophys., 66 : 493-496 .

- Guern, J. 1966. Sur les relations entre métabolisme et transport de la 6-benzylaminopurine- ^{14}C injectée dans les jeunes plantes étiolées de Cicer arietinum .
C. R. Acad. Sci. , Paris, 262 : 2340-2343 .
- Guern, J et Hugon, E. 1966. Remarques à propos du transport de la 6-benzylaminopurine marquée au ^{14}C dans les jeunes plantes étiolées de Cicer arietinum .
C. R. Acad. Sci. , Paris, 262 : 2226-2229 .
- Guern, N. et Sadorge, P. 1967. Polarité du transport de la 6-BAP dans les jeunes plantes étiolées de Cicer arietinum .
C. R. Acad. Sci. , Paris, 264 : 2106-2109 .
- Gupta, G. R. P. et Maheshwari, S. C. 1970. Cytokinins in seed of pumpkin.
Plant Physiol. , 45 : 14-18 .
- Györfy, B., Reidei, G. et Redei, G. 1955. La substance de croissance du maïs laiteux .
Acta Botanica, Acad. Sci. Hungaricae T. : II, Fasc. 1-2 : 57-76.
- Hall, R. H. 1967. Cytokinins in the transfer-RNA : their significance to the structure of t-RNA .
Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances,
F. Wightman et G. Setterfield, Eds., Runge Press, Ottawa : 47-56.
- Hall, R. H. et de Ropp, R. S. 1955. Formation of 6-furfurylaminopurine from DNA breakdown products.
J. Am. Chem. Soc. 77 : 6400 .
- Hall, R. H., Robins, M. J., Stasiuk, L. et Thedford, R. 1966. Isolation of N^6 -(γ - γ -dimethylallyl)adenosine from soluble ribonucleic acid.
J. Am. Chem. Soc. , 88 : 2614 .
- Hall, R. H., Chen, C. M., McLennan, B. D. et Werstiuk, E. 1969. N^6 -(Δ^2 -isopentenyl)adenosine : Biosynthesis and metabolism in cytokinin-requiring tobacco pith tissue .
Abstracts of the papers at XI International Botanical Congress
Seattle, Washington .

- Harada, H. 1966. Effects of photoperiod on the formation of flower bud by flower stalk sections of Cichorium intybus in tissue culture . Bot. Mag. (Tokyo), 79 : 119-123 .
- Hecht, S. M., Leonard, N. J., Burrows, W. J., Armstrong, D. T., Skoog, F. et Occolowitz, J. 1969. Cytokinin of wheat germ transfer RNA : 6-(4-hydroxy-3-methyl-2-butenylamino)-2-methylthio-9- β -D-ribofuranosylpurine . Science, 166, 3910 : 1272-1274 .
- Heide, O. M. et Skoog, F. 1967. Cytokinin activity in Begonia and Bryophyllum . Physiol. Plantarum, 20 : 771-780 .
- Helgeson, J. P. 1968. The cytokinins . Science, 161 : 974-981 .
- Helgeson, J. P. et Leonard, N. J. 1966. Cytokinins : identification of compounds isolated from Corynebacterium fascians . Botany, vol. 56 : 60-63 .
- Hillman, W. S. 1957. Non-photosynthetic light requirement in Lemna minor and its partial satisfaction by kinetin . Science, 126 : 165-166 .
- Jablonski, J. R. et Skoog, F. 1954. Cell enlargement and cell division in excised tobacco pith tissue . Physiol. Plantarum, 7 : 16-24 .
- Kaminek, M. 1965. Acropetal transport of kinetin in pea stem sections Biol. Plant. 7 : 394-396 .

- Kende, H. 1964. Preservation of chlorophyll in leaf sections by substances obtained from root exudate .
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. , 53 : 1066-1067 .
- Kende, H. 1965. Kinetin-like factors in the root exudate of sunflowers.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. , 53 : 1302-1307 .
- Kerr, S.E. et Seraidarian, K. 1945. The separation of purine nucleosides from free purines and the determination of the purines and ribose in these fractions .
J. Biol. Chem. , 159 : 211-225 .
- Kerr, S.E. , Seraidarian, K. et Wargon, W. 1949. Studies on ribonucleic acid. II. Methods of analysis .
J. Biol. Chem. , 181 : 761-771 .
- Klämbt, D. 1968. Cytokinine aus Helianthus annuus .
Planta 82 : 170-178 .
- Klämbt, D. , Thies, G. et Skoog, F. 1966. Isolation of cytokinins from Corynebacterium fascians .
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. , 56 : 52-59 .
- Köhler, K.H. et Conrad, K. 1966. Ein quantitativer Phytokinin-Test.
Biologische Rundschau 4 : 36-37 .
- Koshimizu, K. , Matsubara, S. , Kusaki, T. et Mitsui, T. 1967. Isolation of a new cytokinin from immature yellow lupin seeds .
Agri. Biol. Chem. Vol. 31, N° 7 : 795-801 .
- Kovoor, A. 1953a. Action du jus de raisin sur la croissance des tissus de crown-gall de scorsonère cultivés in vitro .
C.R. Acad. Sci. , Paris, 236, 309-311 .

- Kovoor, A. 1953b. Action stimulante de quelques extraits de fruits et de graines sur le développement des tissus de crown-gall de scorsonère cultivés in vitro .
C.R. Acad. Sci., Paris, 237 : 271-272 .
- Kovoor, A. 1954. Action de quelques substances stimulantes d'origine naturelle sur le développement des tissus végétaux cultivés in vitro .
Année Biol., 58 (N.S.30) : 417-429 .
- Kovoor, A. 1964. Action du lait de coco sur la prolifération des tissus de topinambour .
Régulateurs naturels de la croissance végétale. Colloq. Intern. C.N.R.S. Paris ; 123 : 83-96 .
- Kulaeva, O.N. 1962. The effect of roots on leaf metabolism in relation to the action of kinetin on leaves .
Fiziol. Rast., 9 : 182-188 .
- Kuraishi, S. 1959. Effect of kinetin analogs on leaf growth .
Sci. Papers Coll. Gen. Educ. Univ. Tokyo, 9 : 67-104 .
- Lagerstedt, H. B. et Langston, R. G. 1966. Transport of kinetin 8-¹⁴C in petiole .
Physiol. Plantarum, 19 : 734-740 .
- Letham, D.S. 1963. Zeatin, a factor inducing cell division, isolated from zea mays.
Life Sciences, 2 : 569-573 .
- Letham, D.S. 1964. Isolation of a kinin from plum fruitlets and other tissues .
Régulateurs naturels de la croissance végétale. Colloq. Intern. C.N.R.S., Paris, 123 : 109-117 .

- Letham, D.S. 1966a. Regulators of cell division in plant tissues II. A cytokinin in plant extracts : isolation and interaction with other growth regulators .
Phytochemistry, 5 : 269-286 .
- Letham, D.S. 1966b. Purification and probable identity of a new cytokinin in sweet corn extracts .
Life Sciences, 5 : 551-554 .
- Letham, D.S. 1966c. Isolation and probable identity of a third cytokinin in sweet corn extracts .
Life Sciences, 5 (21) : 1999 - 2004 .
- Letham, D.S. 1967. Chemistry and physiology of kinetin like compounds.
Annual Review of Plant Physiology, 18 : 349-363 .
- Letham, D.S. 1968. A new cytokinin bioassay and the naturally occurring cytokinin complex .
Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances :
F. Wightman and G. Setterfield, Eds., Runge Press, Ottawa : 19-31
- Letham, D.S., Shannon, J.S. et McDonald, J.R. 1964. The structure of zeatin, a factor inducing cell division .
Proc. Chem. Soc. : 230 .
- Letham, D.S. et Williams, M.W. 1969. Regulators of cell division in plant tissues. VIII. The cytokinins of the apple fruit .
Physiol. Plantarum, 22 : 925-936 .
- Lindner, R.C. 1940. Factors affecting regeneration of the horse radish root .
Plant Physiol., 15 : 161-181 .

- Loeffler, J.E. et van Overbeek, J. 1964. Kinin activity in coconut milk .
Régulateurs naturels de la croissance végétale . Colloque Intern ;
C.N.R.S. , Paris, 123 : 77-82 .
- Madison, J.T. , Everelt, G.A. et Kung, H. 1966. Nucleotide sequence
of a yeast tyrosine transfert RNA .
Science, 153 : 531-534 .
- Mann, J.D. , Kung-Hing, Y. , Storey, W.B. , Minn Pu and Conley, J. 1967.
Similarity between phytokinins and herbicidal phenylurethanes.
Plant and Cell Physiol. , 8 : 613-622 .
- Margara, J. 1965. Comparaison in vitro du développement de bourgeons
de la tige florifère de Cichorium intybus L. et de l'évolution
de bourgeons néoformés .
C.R. Acad. Sci. , Paris, 260 : 278-281 .
- Mauney, J.R. , Hillman, W.S. , Miller, C.O. , Skoog, F. , Clayton, R.A.
et Strong, F.M. 1952. The bioassay, purification and properties
of a growth factor from coconut .
Physiol. Plantarum, 5 : 487-497 .
- McCalla, D.R. , Morre, D.J. et Osborne, D.J. 1962. The metabolism of
a kinin, benzyladenine .
Biochem. Biophys. Acta, 55 : 522-528 .
- Mellor, D.P. 1964. Historical background and Fundamental concepts.
Chelating agents and metal chelated (Dwyer and Mellor).
- Michniewicz, M. et Kamienska, A. 1964. Flower formation by kinetin
and vitamin E in a cold-requiring plant (Cichorium intybus L.)
grown under non-inductive conditions .
Naturwiss. 51 : 295-296 .

- Miller, C.O. 1963. Kinetin and Kinetin-like compounds.
Modern methods of plant analysis, 6 : 194-202
(Linskens, H. F., and Tracey, M. V., Eds. , Springer, Berlin)
- Miller, C.O. 1965. Evidence for the natural occurrence of zeatin and derivatives : compounds from maize which promote cell division .
Proc. Nat. Acad. Sci., U.S., 54 : 1052-1058 .
- Miller, C.O., Skoog, F., von Saltza, M.H. et Strong, F.M. 1955.
Kinetin : a cell division factor from deoxyribonucleic acid.
J. Am. Chem. Soc., 77 : 1392 .
- Miura, G.A., et Miller, C.O. 1969. 6-(γ,γ -dimethylallylamino)purine as a precursor of zeatin .
Plant Physiology, 44, n° 3 : 372-376 .
- Most, B.H., Williams, J.C. et Parker, K.J. 1968. Gas chromatography of cytokinins .
Journal of Chromatography, 38 : 136-138 .
- Mothes, K. 1960. Über das Altern der Blätter und die Möglichkeit ihrer Wiederverjungung .
Naturwiss. 47 : 337-351 .
- Murashige, T. 1964. Analysis of the inhibition of organ formation in tobacco tissue culture by gibberellin .
Physiol. Plantarum, 17 : 636-643 .
- Murashige, T. et Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures .
Physiol. Plantarum, 15 : 473-497 .

- Nitsch, C. et Nitsch, J.P. 1967. The induction of flowering in vitro in stem segments of Plumbago indica L. I. The production of vegetative buds .
Planta, 72 : 355-370 .
- Nitsch, J.P. 1954 . L'action, sur la croissance de cultures de tissus du liquide séminal d'Allanblackia parviflora A. Chev.
C.R. Acad. Sci., Paris, 238 : 141-143 .
- Nitsch, J.P. 1956. Method for the investigation of natural auxines and growth inhibitors .
The Chemistry and Mode of Action of Plant Growth Substances : 3-31 .
- Nitsch, J.P. 1960. Présence d'une substance type cinétine dans le jus de tomate .
Bull. Soc. Bot. France, 107 : 263-267 .
- Nitsch, J.P. 1960b La chromatographie double à une dimension et son emploi à la séparation des substances de croissance .
Bull. Soc. Bot. France, 107 : 247-250 .
- Nitsch, J.P. 1962. Basic physiological processus affecting fruit development .
Plant Science Symposium : 5-21 .
- Nitsch, J.P. 1965 . Physiology of flower and fruit development .
Encyclopedia of plant physiology Volume XV/1 .
- Nitsch, J.P. 1966. Phytohormones et genèse des bourgeons végétatifs et floraux .
: Congrès et colloque de l'Univ. de Liège 38 : 265-299 .

- Nitsch, C. 1967. Induction "in vitro" de la floraison chez une plante de jours courts : Plumbago indica L.
Ann. Sci. Nat. Bot., 12ème série, IX : 1-92 .
- Nitsch, J.P. 1967. L'induction de la floraison in vitro : résultats et perspectives .
Bull. Soc. Bot. France : 185-200 .
- Nitsch, J.P. 1968. Natural cytokinins. Plant growth regulators.
Soc. Chem. Ind., London : 111-123 .
- Nitsch, J.P., Bui-Dang-Ha, D. et Nitsch, C. 1966. Extraction d'un facteur de bourgeonnement de l'endive (Cichorium intybus L.).
Bull. Soc. Bot. France , 113 : 425-429 .
- Nitsch, J.P. et Bui-Dang-Ha, D. 1967. Histophysiologie végétale .
Effet de l'ordre d'application de l'acide indolyl-acétique et de la kinétine sur la division cellulaire .
C.R. Acad. Sci., Paris, 264 : 288-291 .
- Nitsch, J.P. et Nitsch, C. 1955. The separation of natural plant growth substances by paper chromatography .
Beitrag Biologie der Pfl., 31 : 387-408 .
- Nitsch, J.P. et Nitsch, C. 1955. Action synergique des auxines et du jus de tomates sur la croissance des tissus végétaux cultivés in vitro .
Bull. Soc. Bot. France, 102 : 519-527 .
- Nitsch, J.P. et Nitsch, C. 1956. Studies in the growth of coleoptile and first internode sections. A new, sensitive, straight-growth test for auxins .
Plant Physiology, 31 : 94-111 .

- Nitsch, J. P. et Nitsch, C. 1957. Auxin-dependent growth of excised Helianthus tuberosus tissues. II .
Am. Journ. Bot. , 44 : 555-564 .
- Nitsch, J. P. et Nitsch, C. 1960. Le problème de l'action des auxines sur la division cellulaire. Présence d'un cofacteur de division dans le tubercule de topinambour .
Ann. Physiol. Vég., 4 : 261-268 .
- Nitsch, J. P. et Nitsch, C. 1961. Growth factors in the tomato fruit.
Plant Growth Regulation, Iowa State Univ. Press : 687-705 .
- Nitsch, J. P. et Nitsch, C. 1964. Néoformation de boutons floraux sur cultures in vitro de feuilles et de racines de Cichorium intybus L. Existence d'un état vernalisé en l'absence de bourgeons .
Bull. Soc. Bot. France, 111 : 299-304 .
- Nitsch, J. P. et Nitsch, C. 1965b. Présence d'une phytokinine dans le **cambium** de peuplier .
Bull. Soc. Bot. France, 112 : 1-10 .
- Nitsch, J. P. et Nitsch, C. 1965a. Présence de phytokinines et autres substances de croissance dans la sève d'Acer saccharum et de Vitis vinifera .
Bull. Soc. Bot. France, 112 : 11-18 .
- Osborne, D. J. et Black, M. K. 1964. Polar transport of a kinin, **benzyladenine** .
Nature, 201 : 97 .
- Osborne, D. J. et McCalla, D. R. 1961. Rapid bioassay for kinetin and kinins using senescing leaf tissue .
Plant Physiol. , 36 : 219-221 .

- Parthier, B. 1964. Proteinsynthese in grünen Blättern. II. Aminosäure, Inkorporation in die Protein subzellulärer Strukturen in Abhängigkeit vom physiologischen Zustand der Blätter (Blattalter).
Flora, 154 : 230-244 .
- Paulet, P. et Nitsch, J.P. 1959. Stimulation chimique du bourgeonnement chez Cardamine pratensis L.
Bull. Soc. Bot. France, 106, n° 9 : 425-441 .
- Paulet, P. et Nitsch, J.P. 1964a. Néoformation de fleurs in vitro sur des cultures de tissus de racine de Cichorium intybus L.
C.R. Acad. Sci., Paris, 258 : 5952-5955 .
- Paulet, P. et Nitsch, J.P. 1964b. La néoformation de fleurs sur cultures in vitro de racines de Cichorium intybus L. Etude physiologique .
Ann. Physiol. Vég., 6 : 333-345 .
- Paulet, P. 1965. Etude de la néoformation in vitro de bourgeons végétatifs et floraux .
Rev. Gén. Bot., 72 : 697-792 .
- Pilet, P.E., Guern, J. et Hugon, E. 1967. Sur le transfert de la 6-benzylamino purine ^{14}C .
Physiol. Végétale, vol. 5 : 261-270 .
- Powell, L.E. et Pratt, C. 1964. Kinins in the embryo and endosperm of Prunus persica .
Nature, 204 : 602-603 .
- Reinert, J. et Besemer. 1967. Gibberellin Säure, ein inhibitor morpho-genetischer .
Wissen, Zeitsch., Rostock : 599-604 .

- Reid, D.M. et Burrows, W.J. 1968. Cytokinin-like and gibberellin-like activity in the spring sap of trees .
Experientia, 24 : 189-190 .
- Richmond, A.E., et Lang, A. 1957. Effect of kinetin on protein content and survival of detached xanthium leaves .
Science, 125 : 650-651 .
- Rogozinska, J.H., Helgeson, J.P. et Skoog, F. 1964. Test for kinetin like Growth Promoting Activities of triacanthine and its isomer, 6(γ , γ -dimethylallylamino)-purine .
Physiologia Plantarum, Vol. 17 : 165-176 .
- Rogozinska, J.H., Helgeson, J.P., Skoog, F., Lipton, S.H. et Strong, F.M. 1965. Partial purification of a cell division factor from peas .
Plant Physiol. , 40 : 469-476 .
- Schneider, M.J. et Voth, P.D. 1965. Phytokinins in Marchantia polymorpha.
Plant Physiol. , 40 : supplément : LXXVIII .
- Schouteden-Wery, J. 1920. Quelques expériences de régénération des bourgeons chez les racines de Chicorée .
Bull. Acad. Roy. Belg., Cl. Sc. V 6 : 152-166 .
- Schraudolf et Reinert. 1959. Interaction of plant growth regulators in regeneration process .
Nature, 184 : 465-466 .
- Seth, A.K., Davies, C.R. et Wareing, P.F. 1966. Auxin effects on the mobility of kinetin in the plant .
Science, 151 : 587-588 .
- Seth, A. et Wareing, P.F. 1965. Isolation of a kinin-like root factor in Phaseolus vulgaris .
Life Sci. , 4 : 2275-2280 .

- Shantz, E.M. et Steward, F.C. 1952. Coconut milk factor : the growth-promoting substances in coconut milk ,
J. Am. Chem. Soc., 74 : 6133-6136 .
- Shantz, E.M. et Steward, F.C. 1955. The identification of compound A from coconut milk as 1,3-diphenylurea .
J. Am. Chem. Soc., 77 : 6351-6353 .
- Shantz, E.M. et Steward, F.C. 1968. A growth substance from the vesicular embryo sac of Aesculus .
Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances,
F. Wightman et G. Setterfield, Eds., Runge Press, Ottawa :
893-909 .
- Shaw, M. et Srivastava, S.B.I. 1964. Purine-like substances from coconut endosperm and their effect on senescence in excised cereal leaves .
Plant Physiol., 39 : 528-532 .
- Skoog, F. and Tsui, C. 1948. Chemical control of growth and bud formation on tobacco stem and callus cultured in vitro .
Am. J. Botany, 35 : 782-787 .
- Skoog, F. et Miller, C.O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro .
Symp. Soc. exp. Biol., 11 : 118-130 .
- Stahl, E. 1958. Dünnschicht-Chromatographie. II. Standardisierung, Sichtbarmachung, Dokumentation und Anwendung.
Chemiker-Zeitung, 82 : 323 .
- Steward, F.C. et Caplin, S.M. 1952. Investigations on growth and metabolism of plants cells. IV. Evidence on the role of the coconut-milk factor in development .
Ann. Bot. N.S., 16 : 491-504 .

- Steward, F.C. et Shantz, E.M. 1954. The growth of carrot tissue explants and its relation to the growth factors in coconut milk. II. The growth-promoting properties of coconut milk for plant tissue culture. Culture de tissus Végétaux, U.I.S.B., 20 : 400-415 .
- Steward, F.C. et Simmonds, N.W. 1954. Growth-promoting substances in the ovary and immature fruit of the banana .
Nature, 173 : 1083 .
- Syono, K. 1965. Changes in the response of carrot root calluses to the root extract occurring during their successive cultures .
Plant and Cell Physiol., 6 : 285-300 .
- Tizio, R. 1966. Présence de kinines dans le périderme de tubercules de pomme de terre .
C.R. Acad. Sci., Paris, 262 (D) : 868-869 .
- Toponi, M. 1963a. Sur la culture de fragments de feuilles d'endive .
(Cichorium intybus L.) .
C.R. Acad. Sci., Paris, 257 : 3212-3215 .
- Toponi, M. 1963b. Action combinée de la kinétine et de l'acide indolyl-acétique sur la néoformation d'organes par des fragments de feuilles d'endive (Cichorium intybus L.) cultivés in vitro .
C.R. Acad. Sci., 257 : 3030-3033 .
- Torrey, J.G. 1961. Kinetin as trigger for mitosis in mature endomitotic plant cells.
Expt. Cell Res., 23 : 281-299 .
- Van Overbeek, J., Siu, R. et Haagen-Smit, A.J. 1944. Factors affecting the growth of Datura embryos in vitro .
Amer. J. Bot., 31 : 219-224 .

- Vardjan, M. et Nitsch, J.P. 1961. La régénération chez Cichorium intybus L. Etude des auxines et des kinines endogènes. Bull. Soc. Bot. France, 108 : 363-374 .
- Warmke, H.E. et Warmke, G.L. 1950. The role of auxin in the differentiation of root and shoot primordia from cuttings of Taraxacum and Cichorium . Amer. J. Bot. , 37 : 272-280 .
- Went, F.W. et Bonner, D.M. 1943. Growth factors controlling tomato stem growth in darkness . Arch. Biochem. , 1 : 439-452 .
- Witham, F.H. et Miller, C.O. 1965. Biological properties of a kinetin like substance occurring in Zea mays ; Physiol. Plantarum, 18 : 1007-1017 .
- Wood, H.N. 1964. The characterisation of naturally occurring kinins from crown-gall tumor cells of Vinca rosea L. Régulateurs naturels de la croissance végétale. Colloq. Intern. C.N.R.S. , Paris, 123 : 97-102 .
- Wood, H.N. , Braun, A.C. , Brandes, H. et Kende, K. 1969. Studies on the distribution and properties of a new class of cell division-promoting substances from higher plant species . Proceedings of the National Academy of Sciences, 62 : 349-356 .
- Zachau, H.G. , Dütting, D. , Feldmann, H. 1966. The structure of a seryl-t-RNA . Angew. Chem. 78 : 392 .
- Zwar, J.A. et Skoog, F. 1963. Promotion of cell division by extracts from pea seedlings . Australian J. Biol. Sci. , 16 : 129-139 .

Zwar, J.A., Bottemley, W., et Kefford, N.P. 1963. Kinin activity from plant extracts. II. Partial purification and fractionnation of kinins in apple extracts .
Aust. J. Biol. Sci., 16: 407-415 .

Zwar, J.A., Bruce, M.I., Bottomley, W. et Kefford, N.P. 1964. A comparison of the kinins of apple and coconut milk and of the modifications produced by purification procedures .
Régulateurs narurels de la croissance végétale . Colloq. Intern. C.N.R.S., Paris, 123 : 123-130 .

Vu et Approuvé

PARIS, le 12 mai 1971

Le Président de l'Université de PARIS VI

Mr. HERPIN

